

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-037194

(43)Date of publication of application : 08.02.2000

---

(51)Int.Cl. C12N 15/09

C12Q 1/68

---

(21)Application number : 11-179056

(71)Applicant : ENZO DIAGNOSTICS INC

(22)Date of filing : 24.06.1999

(72)Inventor : RABBANI ELAZAR  
STAVRIANOPOLOUS JANNIS G  
DONEGAN JAMES J  
COLEMAN JACK  
WALNER MARLEEN

---

(30)Priority

Priority number : 98 104067 Priority date : 24.06.1998 Priority country : US

---

**(54) POSTTERMINATION LABELING PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID OR FOR NUCLEIC SEQUENCE AND NEW METHOD FOR FORMING NUCLEIC ACID HAVING REDUCED THERMODYNAMIC STABILITY**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To linearly amplify a specific nucleic acid sequence by incubating a specific nucleic acid sequence, a specific primary primer or the like, a substrate, a buffer solution and a template dependent polymerization enzyme under a balanced or a limited cycling condition.

**SOLUTION:** A specific nucleic acid sequence is linearly amplified by incubating a specific nucleic acid sequence by the use of a primary primer or a nucleic acid fabric which contains (A) the first segment that is complementary to the first part in the above specific nucleic acid sequence and can perform the template dependent first extension and (B) the second segment that is not identical to the component A and identical to the second part in the above specific nucleic acid sequence, can combine with the sequence complementary to this component B, performs the second primer extension and can provide the linkage of the first segment in the second primer or the nucleic acid fabric to the first part in the successive above specific nucleic acid sequence so as to substrate the first primer extension under a balanced or a limited cycling condition in the presence of a substrate, a buffer solution and a template dependent polymerization enzyme.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-37194

(P2000-37194A)

(43) 公開日 平成12年2月8日(2000.2.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	P 1	キーワード(参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数59 O L (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願平11-179056	(71) 出願人	586088586 エンゾー ダイアグノスティクス、 イン コーポレイテッド Enzo Diagnostics, I nc. アメリカ合衆国 ニューヨーク 10022, ニューヨーク, マディソン アベニュー (9 ティーエイチ フロア) 527, エンゾー バイオケム, インコーポレ イテッド内
(22) 出願日	平成11年6月24日(1999.6.24)	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塚 竹彦
(31) 優先権主張番号	09/104,067		
(32) 優先日	平成10年6月24日(1998.6.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を増幅するため、核酸配列のための核酸複製プロセス、および減少した能力学安定性を有する核酸を生成するための新規の方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 核酸増幅、核酸配列決定及び重要な特徴を有する独特の核酸の生成に有用かつ応用可能な新規プロセスの提供。

【解決手段】 特定の核酸配列を直接的に増幅するためのプロセスであって、以下の工程：該特定の核酸配列、初期プライマー又は核酸構築物であって、特定の条件下で第2のプライマー又は核酸構築物の第1のセグメントの続く該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る2つのセグメントを含む、初期プライマーまたは核酸構築物；並びに基質、緩衝液、及びテンプレート依存性重合化酵素；を提供する工程；並びに均衡または限定サイクリング条件下で該基質、緩衝液、及びテンプレート依存性重合化酵素の存在下で該特定の核酸配列および該新規プライマー又は核酸構築物をインキュベートし；それにより該特定の核酸配列を直接的に増幅する工程を包含するプロセス。

(2)

特開2000-37194

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定の核酸配列を直接的に増幅するためのプロセスであって、以下の工程：

該特定の核酸配列、

初期プライマーまたは核酸構築物であって、以下の2つのセグメント：

(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列に第1の部分に実質的に相補的であり、そして(i) i) テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および(B) 第2のセグメントであって (i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、(i i) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(i i i) 該第2のセグメントの相補的な配列に結合し得、そして(i v) 第2のプライマー伸長が生成され、そして第1のプライマー伸長を置換するように、均質または限定サイクリング条件下で、第2のプライマーまたは核酸構築物の第1のセグメントの、続く該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメントを含む、初期プライマーまたは核酸構築物；ならびに、基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素；を提供する工程；ならびに、

均質または限定サイクリング条件下で該基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を直接的に増幅する工程、を包含する、プロセス。

【請求項2】 前記初期プライマーまたは核酸構築物と前記第2のプライマーまたは核酸構築物とが同じである、請求項1に記載のプロセス。

【請求項3】 前記初期プライマーまたは核酸構築物と前記第2のプライマーまたは核酸構築物とが異なる、請求項1に記載のプロセス。

【請求項4】 前記第1のセグメントもしくは該第2のセグメントもしくは前記プライマー伸長、または前述の任意のものが、少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項5】 前記第2のセグメントが、前記プライマー伸長においてその相補体に対する前記第1のセグメントの熱力学的安定性を増加する少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項4に記載のプロセス。

【請求項6】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログがインターカレート剤を含む、請求項4または請求項5に記載のプロセス。

【請求項7】 前記第1のセグメントまたは前記プライマー伸長あるいはその両方が、少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項8】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌク

2

レオチドアナログが、その相補体に対する前記第1のセグメントまたは前記プライマー伸長の熱力学的安定性を減少させる、請求項7に記載のプロセス。

【請求項9】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、負に荷電した化学基を含む、請求項8に記載のプロセス。

【請求項10】 前記負に荷電した化学基がカルボン酸を含む、請求項9に記載のプロセス。

【請求項11】 前記初期プライマーもしくは核酸構築物、または前記第2のプライマーもしくは核酸構築物、あるいはその両方が、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、あるいは任意の前述の組み合わせを含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項12】 特定の核酸配列を非直接的に増幅するためのプロセスであって、以下の工程：

該特定の核酸配列、

該特定の核酸配列についての第1の初期プライマーまたは核酸構築物であって、該第1の初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント：

(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(i) i) テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および

(B) 第2のセグメントであって、(i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、そして(i i) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(i i i) 該第2のセグメントの相補的な配列に結合し得、そして(i v) 第2のプライマー伸長が生成されて第1のプライマー伸長を置換するように、均質または限定サイクリング条件下で、続く第2のプライマーまたは核酸構築物の第1のセグメントの、該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメント、を含む；ならびに、

該特定の核酸配列の相補体に対する続く初期プライマーまたは核酸構築物であって、該続く初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント、

(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(i) i) テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および

(B) 第2のセグメントであって、(i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、(i i) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(i i i) 該第2のセグメントの相補的な配列に結合し得、そして(i v) 第2のプライマー伸長が生成され、そして第1のプライマー伸長を置換するように、均質または限定サイクリング条件下で、続くプライマーの第1のセグメントの、該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメント、を含む；ならびに基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素；を提供する工程；

(3)

特開2000-37194

3

4

ならびに、

均衡または限定サイクリング条件下で、該基質、緩衝液、またはテンプレート依存性重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非直線的に増幅する、工程、を包含する、プロセス。

【請求項13】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物と前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物とが同じである、請求項12に記載のプロセス。

【請求項14】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物と前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物とが異なる、請求項12に記載のプロセス。

【請求項15】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物の前記第1のセグメントまたは前記第2のセグメント、前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物の前記第1のセグメントまたは前記第2のセグメント、および前記プライマー伸長、または前述の任意のものからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項12に記載のプロセス。

【請求項16】 前記第1の初期プライマーまたは前記第2の初期プライマーまたはその両方の前記第2のセグメントが、前記プライマー伸長における前記第1のセグメントのその相補体に対する熱力学的安定性を増加させる少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項15に記載のプロセス。

【請求項17】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログがインターカレート剤を含む、請求項15または16に記載のプロセス。

【請求項18】 前記第1の初期プライマーの前記第1のセグメント、または前記第2の初期プライマーの前記第1のセグメント、またはその両方、またはそれらのプライマー伸長、またはそれらの任意の組合せが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項12に記載のプロセス。

【請求項19】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、前記第1のセグメントまたは前記プライマー伸長、またはその両方の、その相補体に対する熱力学的安定性を減少させる、請求項18に記載のプロセス。

【請求項20】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、負に荷電した化学基を含む、請求項19に記載のプロセス。

【請求項21】 前記負に荷電した化学基がカルボン酸を含む、請求項20に記載のプロセス。

【請求項22】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいは前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいはその両方が、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸およびベプチド-核酸、または前述の任意の

ものの組合せからなる群から選択される核酸を含む、請求項12に記載のプロセス。

【請求項23】 特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスであって、以下の工程：

該特定の核酸配列およびその相補体；該特定の核酸配列のための第1の初期プライマーまたは核酸構築物、ここで該第1の初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント：

(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(i) テンプレート依存性の第1の伸長が可能であるセグメント、および(B) 第2のセグメントであって、

(i) 該第1のセグメントに実質的に隣接しており、

(ii) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に隣接しており、(iii) 該第2のセグメントの相補的な配列へ結合し得、そして(iii) 第2のプライマー伸長が生成されそして該第1のプライマー伸長を置換するよう

な、均衡または限定サイクリング条件下で、続く第1のプライマーの第1のセグメントの該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメントを含む；

および該第1のプライマー伸長に対して相補的な第2の初期プライマーまたは核酸構築物、ここで該第2の初期

プライマーまたは核酸構築物が、均衡または限定サイクリング条件下で、テンプレート依存性の伸長をし得ることを特徴とするセグメントを含む；ならびに

基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素；を提供する工程

均衡または限定サイクリング条件下で、該基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および前記新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非直線的に増幅する工程、を包含する、プロセス。

【請求項24】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物の前記第1のセグメントまたは前記第2のセグメント、前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物の該セグメント、および該プライマー伸長、または前述の任意のものからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項23に記載のプロセス。

【請求項25】 前記第1の初期プライマーの前記第2のセグメントが、前記プライマー伸長において前記第1のセグメントのその相補体に対する熱力学的安定性を増加させる少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項24に記載のプロセス。

【請求項26】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログがインターカレート剤を含む、請求項24または25に記載のプロセス。

15

20

30

40

50

(4)

特開2000-37194

5

6

【請求項27】 前記第1の初期プライマーの前記第1のセグメントまたは前記第2の初期プライマーの前記セグメント、またはその両方、またはそれらのプライマー伸長、またはそれらの任意の組合せが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項23に記載のプロセス。

【請求項28】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、前記第1のセグメントまたは前記プライマー伸長、またはその両方の、その相補体に対する熱力学的安定性を減少させる、請求項27に記載のプロセス。

【請求項29】 前記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、後に高電した化学基を含む、請求項28に記載のプロセス。

【請求項30】 前記第1の高電した化学基がカルボン酸を含む、請求項29に記載のプロセス。

【請求項31】 前記第1の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいは前記第2の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいはその両方が、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸およびペプチド-核酸、または前述の任意のものの組合せからなる群から選択される核酸を含む、請求項23に記載のプロセス。

【請求項32】 特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスであって、以下の工程：

該特定の核酸配列；非直線的な増幅が可能な単一のプライマーまたは単一の核酸構築物であって、以下の3つのセグメント：

(a) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(i) テンプレート依存性の第1の伸長が可能である、セグメント；

(b) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一である第2のセグメント；および

(c) 該第1のセグメントに実質的に同一である第3のセグメント；を含みここで、前記第1のプライマー伸長は該第2のセグメントにハイブリダイズし得、そして該第3のセグメントに対する相補体を生成するように自己プライミングおよび自己伸長し得る配列を生成し得る、および基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素；を提供する工程、ならびに該基質、緩衝液およびテンプレート依存性の重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非直線的に増幅する工程、を包含する、プロセス。

【請求項33】 均衝条件、限定サイクリング条件、および完全なサイクリング条件からなる群から選択される条件下で行われる、請求項32に記載のプロセス。

【請求項34】 前記第1のセグメント、前記第2のセグメント、前記第3のセグメント、前記第1のプライマー伸長、前記第2のプライマー伸長、または前述の任意

のもののからなる群から選択されるメンバーが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項32に記載のプロセス。

【請求項35】 前記単一プライマーまたは核酸構築物が、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、または前述の任意のものの組合せからなる群から選択される核酸を含む、請求項32に記載のプロセス。

【請求項36】 前記第1のセグメント、前記第2のセグメント、前記第3のセグメント、前記第1のプライマー伸長および前記自己プライミング伸長、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択されるメンバーが、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む、請求項32に記載のプロセス。

【請求項37】 前記第1のプライマー伸長が、限定された基質条件、限定された伸長持続時間、またはその両方からなる群から選択される条件下で行われる、請求項32に記載のプロセス。

【請求項38】 前記特定の核酸配列が1本鎖または2本鎖の形態である、請求項1、12、23、または32のいずれかに記載のプロセス。

【請求項39】 前記特定の核酸配列がフラグメント中に見出されるかまたは含まれている、請求項1、12、23、または32のいずれかに記載のプロセス。

【請求項40】 前記フラグメントが物理的手段、化学的手段、物理化学的手段、および酵素的手段、またはそれらの組合せからなる群から選択される手段によって生成される、請求項39に記載のプロセス。

【請求項41】 前記物理的手段が、超音波処理および加熱、またはその両方からなる群から選択される、請求項40に記載のプロセス。

【請求項42】 前記化学的手段が酸処理を含む、請求項40に記載のプロセス。

【請求項43】 前記酵素的手段がヌクレアーゼおよび制限酵素によってまたはそれらを用いて行われる、請求項40に記載のプロセス。

【請求項44】 前記ヌクレアーゼがエンドヌクレアーゼを含む、請求項43に記載のプロセス。

【請求項45】 核酸の配列決定のための終結後増幅プロセスであって、以下の工程：タグ化されていないまたは標識されていない基質、タグ化されていないまたは標識されていないプライマー、重合化酵素、緩衝液、およびそれぞれのヌクレオチド塩基についての適切なタグ化されていないまたは標識されていないターミネーターの存在下で、目的の該核酸配列に対応する核酸フラグメントを生成する工程であって、ここで、該ターミネーターのそれぞれは、内部配列が該タグ化分子に対して実質的に非反応性であり、そして該化学反応が媒体またはマトリックス中で該フラグメントの分離を実質的に妨げないような条件下で、タグ化分子と共有結合する化学的な反

(5)

特開2000-37194

7

8

応基を含む工程；媒体またはマトリックス中で生成された該フラグメントを分離する工程；および該媒体またはマトリックス中で該タグ化分子を検出することによって該分離されたフラグメントを検出する工程を包含する、プロセス。

【請求項46】 前記生成工程の、前記ターミネーターの前記化学的反応基が、生成されそして任意のタグ化分子に共有結合する前に脱保護された前記フラグメントへの酵素的取り込み前に保護される、請求項45に記載のプロセス。

【請求項47】 前記生成工程の、前記化学的反応基が塩基、硫黄または酸素原子を含む、請求項45に記載のプロセス。

【請求項48】 前記ターミネーター上の前記化学的反応基が異なる、請求項45に記載のプロセス。

【請求項49】 前記ターミネーター上の前記化学的反応基が同じである、請求項45に記載のプロセス。

【請求項50】 前記生成工程の、前記タグ化分子がそれぞれのターミネーターと同じである、請求項45に記載のプロセス。

【請求項51】 前記生成工程の、前記タグされた分子がそれぞれのターミネーターと異なる、請求項45に記載のプロセス。

【請求項52】 前記タグ化分子が、蛍光色素、化学発光色素、赤外色素、化学発光素体および電気化学発光素体、またはそれらの組合せからなる群から選択される、請求項45に記載のプロセス。

【請求項53】 前記分離工程が電気泳動的に行われる、請求項45に記載のプロセス。

【請求項54】 前記分離工程の、前記媒体またはマトリックスがゲルを含む、請求項45に記載のプロセス。

【請求項55】 前記ゲルがポリアクリルアミドゲルを含む、請求項45に記載のプロセス。

【請求項56】 前記分離工程がキャピラリーゲル電気泳動によって行われる、請求項45に記載のプロセス。

【請求項57】 前記検出工程が、光度測定、分光光度測定、比色定量測定、蛍光定量測定、延遲蛍光測定および化学発光測定、またはそれらの組合せから選択される手段によって行われる、請求項45に記載のプロセス。

【請求項58】 相補的な配列に対する減少した熱力学的安定性を有する核酸配列を生成するプロセスであり、該プロセスは負に荷電した化学部分を有する少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを、該生成された核酸配列へと組み込む工程を包含する、プロセス。

【請求項59】 直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、または前述の任意のものの組合せからなる群から選択される1本鎖または2本鎖の核酸ポリマーであって、ここで該核酸ポリマーは、1つまたは両方の鎖において1つの負に荷電した化学部分を含む

少なくとも1つのプリンまたはピリミジン塩基を含む、核酸ポリマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、組換え核酸技術の分野に関し、より詳細には、核酸増幅、核酸配列決定のための終結後標識、および減少した熱力学安定性を有する核酸の生成のためのプロセスに関する。

【0002】本明細書において引用または同定される全ての特許、特許明細書、特定の文献などは、本発明が属する最先端技術をより完全に記載するために、それらの全体が参考として本明細書中に採用される。

【0003】

【従来の技術】極端的な増幅の首尾良いインビトロ指数関数的増幅について記載されている最初の系は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である(Saikiら、1985 Science 230:1350-1354)。PCRは、対立遺伝子決定、法医学的同一性、遺伝子分析、診断、クローニング、直接配列決定、および他の適用に幅広く使用されている。続いて、逆転写酵素(RT)

は、RNA分子をDNAコピーに影響転換するために使用され、DNAポリメラーゼによるPCR増幅のための基質としてRNA分子の使用を可能にした。さらに、特定のDNAポリメラーゼがそれら自身による逆転写を行うことを可能にする条件が記載されており(Myers、T. W. および Gelfand、D. H. [1991] Biochem. 30:7661-7666)。

【0004】その内容を本明細書中で参考として採用する。最後に、Roseら(米国特許第5,508,178号、これもまた本明細書中で参考として採用する)は、単一のプライマーの使用が、極端的な増幅の基末端からポリマー化を開始して、1本鎖形態のPCRアンプリコンを作製することを可能にする、PCRプライマー配列の選択と逆反復配列の使用を記載しており、この逆反復配列は、各末端での自己相補配列を有する「パン-ハンドル(pan-handle)」として描かれ得る。逆反復を欠く標的を利用するために、この群はまた、PCRアンプリコンに配列を導入し、その結果最終産物が、各末端で自己相補配列を有するための種々の方法を記載している(米国特許第5,439,793号、同第5,595,891号、および同第5,612,199号、その各々を、本明細書中で参考として採用する)。

【0004】本来のPCR増幅および種々の改良されたPCR系の両方は、PCR法に本来備わっている複数の温度条件を提供するための高価な専用サーモサイクラーの必要性の假定で悩む。この必要性は、プライマーの長さ、それを作製するのに使用されたプライマーよりも強力なテンプレートとの結合を有する産物を作製するという問題に由来する。そのようなものとして、PCRの様々な系において、プライマーの結合を可能にする温度

(5)

特開2000-37194

9

10

は、そのテンプレートから伸長産物の分離させるためには低すぎる温度、そして伸長産物を分離させるのに十分上昇される温度は、他のプライミング事象を可能にするには高すぎる。第2のプライミング事象は、第1の伸長鎖がそのテンプレートから分離された後まで、生じ得ない。そのようなものとして、PCR増幅において、テンプレートへのプライマー結合およびテンプレートから伸長したプライマーの続く遊離は、別々の異なる温度で行われなければならない、そして別々の加熱工程の反復配列を提供するためのサーモサイクラーが必要である。異なる条件を有する不連続サイクルの存在もまた、各個別の加熱工程の至適温度ならびに各工程のための適切なタイミングを必要とする。同様の問題もまた、LCR反応において連鎖が使用される場合に適用し（Backman, Kら、欧州特許出願公開第0 320 308号、Landerren, U. ち、1988 Science 241:1077, Wu, DおよびWallace, R. B. 1989 Genomics 4:560, Barany, F. 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:189）。ここで個別のプロープを結合するのに必要な温度は、連結率象によってそれらが安定化された後にそれらを遊離するのに必要な温度よりも低い。前述の文書の全てを、本明細書中で参考として援用する。

【0005】他者は、これらの限定を認識しており、そして等温条件下で複数のサイクルを達成する手段を提供することによってそれらを克服することを試みている。この例は、3SR（Kwon, D. Y. ち、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）およびNASBA（Kievits, T. ち、1991 J. Virol. Methods 35:273-286）。その各々の内容を、本明細書中で参考として援用する。前述の各系は、増幅される核酸の増殖へのRNAプロモーターの導入の必要性の限定を有する。従って、これらの系が、目的の配列のDNAとRNA形態との間のサイクリング反応に依存するという限定もまた存在する。RNA中間体の生成に基づく依存性は、RNase（環境に曝露し、そして生物学的由来の試料に頻りに存在する酵素）への感受性の限定を誘導する。さらに、これらの増幅系の設計の性質は、それらが以下の4つの別々の酵素活性を必要とするさらなる限定を有する：DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase H、およびRNAポリメラーゼ。TMA反応において、これらの活性は、逆転写酵素およびRNAポリメラーゼ酵素によって提供されるのに対して、3SRおよびNASBAにおいて、それらは、逆転写酵素、RNase H、およびRNAポリメラーゼ酵素によって提供される。これらの各々の活性は、継続的である系に必要であり、そしてそれ自体、各機能を個別に試験および測定する製造者の必要性が存在し、それにより単一の酵素活性

を利用する系と比較してコストが増加する。さらに、最小限で、少なくとも2つの異なる酵素が、全ての必要な機能を提供するために使用されなければならない。従って、これらの系を、単一の酵素を利用するものより高価にする。さらに、これらの系は、反応のための試薬として存在するリボヌクレオチドならびにデオキシリボヌクレオチドを必要とする。複数の活性の存在はまた、生物学的試料に存在し得る種々のインヒビターによる不活化に弱くより多くの工程を作製する。

【0006】Walkerら（Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1992, 89:392-396、本明細書中で参考として援用する）によって記載される鎖置換増幅（Strand Displacement Amplification）法において、等温増幅は、プライマー内の制限酵素部位の封入によって行われ、その結果制限酵素による消化は、単一の温度で所定のテンプレートからの、一連のプライミング、伸長、および遊離反応を可能にする。しかし、これらの系は、ポリメラーゼおよび基質についての基本的な必要性に加えて、3つのさらなるエレメントがそれらの発明を行うために必要であるという限定を有する。第1に、プライミングが行われる部位での適切な制限酵素部位の存在の必要性が存在する；第2に、示される第2の酵素（制限酵素）の存在の必要性が存在し、そして最後に、特異的に改変された基質（例えば、存在するdNTPのデオキシ糖体）の必要性が存在する。この方法のバリエーションが記載されており（米国特許第5, 270, 184号、本明細書中で参考として援用する）。ここで、機能的における制限酵素部位の必要性の限定が、制限酵素部位を有するプライマーに隣接する第2のプライマーセットの使用によって排除されている。しかし、このバリエーションにおいて、系は、第2のプライマーセットについての必要性の新たな限定を有する一方、制限酵素および改変基質についての他の2つの限定の必要性を有することが記載される。

【0007】完全なサイクル増幅の種々の工程に使用される温度は、各工程に本来備わる物理学的制約によって決定される。そのようなものとして、先行技術において、テンプレートから伸長した鎖の完全な置換に使用される温度は、代表的には約92-95℃である。この高温は、分離の適切な効率を保證するために使用されており、その結果、伸長鎖は、続く反応のためのテンプレートとして使用され得る。PCRが最初に記載された場合、ポリメラーゼは、E. coliに由来し、そしてそのようなものとして、より多くの酵素の添加を必要とする高活性工程の後のポリメラーゼの本質的に完全な熱不活化が存在した（Saikiら、1985 Science 230:1350-1354）。この問題は、PCR反応における、好熱性細菌 *T. aquaticus* 由来のDNAポリメラーゼの使用によって取り扱われた

(7)

特開2000-37194

11

(Saitoら、1988 Science 239: 487-491)。前述のSaitoの刊行物の各々を、本明細書中で参考として援用する。その固有の熱安定性に起因して、酵素は、PCRサイクルを通して持続的に存在し、そしてさらなる添加を必要としない。この時以来、他の好熱性由来のポリメラーゼもまた単離されており、そして完全なサイクル反応において使用されている。しかし、それらは、熱不活化への耐性においてより頑強であるにもかかわらず、これらのポリメラーゼは全て、変性に使用される温度での特定の酵素について10の半減期によって決定される各変性工程後に、特定のレベルの不活化の限度に苦しむ。高い変性温度もまた、加水分解によってdNTP濃度のレベルを減少し得、そして補充剤に反応の効率または特異性を付加し得るタンパク質の不活化を導く。

[0008] 完全なサイクルのPCRの条件は、より低い変性温度が使用され得るように改良されている。Auerら(1996, Nucl. Acids Res 24:5021-5025, 本明細書中で参考として援用する)は、dITP (dGTPの天然の中性アナログ)を使用する手順を記載している。この置換によって、彼らは、それらのサンプルに存在し得る2本鎖DNAの増幅を回避することに成功し、そしてRNA標的のみを増幅した。決して、DNA標的の有用性の認識または適用は存在しない。哀哉、彼らは、彼らの目的が、DNA標的をテンプレートとして使用することを避けることである場合、教示する。彼らの教示は、dITPの置換もまた、アニーリングに使用される温度(50°C)における代償的な減少を必要とする、という限定を有する。さらに、Auerらに記載される分野は、塩基対形成の区別を欠くことが公知であるヌクレオチドアナログの使用に依存し、それにより、増幅される配列に導入されるランダムな変化の可能性を誘導する。これらの変化がプライマー結合領域にある場合、それらはプライミング効率における問題を引き起こし得、そして変化がプライマー間の配列にある場合、変化は効率的な結合を可能にする検出プローブにおける困難を誘導し得る。本発明は、正常なレベルの塩基対形成を指示する塩基を用い得、それにより先行技術の一部である変異原性事象を回避し得る。

[0009] 遺伝子およびゲノムの核配列の決定は、商業および非営利団体の研究の両方における主要な働きである。この目的に使用されている2つの基本的な系は、MaxamおよびGilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1977, 74: 560-564)によって記載される塩基特異的切断法、およびSangerら(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1977, 74: 5493-5497)によって記載されるジデオキシ法である。前述の古典的な両方の文獻を、本明細書中で参考と

12

して援用する。その使用の簡単さに起因して、後者の方法が、より一般的に使用される。これらの両方の方法は、最初に、配列情報を得るための放射活性基質に依存した。MaxamおよびGilbert配列決定について、このことは、各鎖を末端標識し、次いで各標識化末端を分離することによって最も一般的に行われた。Sanger配列決定について、いずれかのプライマーが標識されるか、または放射活性dNTPが鎖伸長の間に取り込まれる。配列データは、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動によって分離されている様々な長さの放射活性標識されたDNAバンドの位置のオートラジオグラフィー決定によって生成された。

[0010] より近年において、配列決定法は、非放射活性標識の代替によって改良されている。これらの標識についての非放射活性標識した潜在的な位置、およびそれらの使用の適用は、Engelhardtらによって、米国特許第5,241,060号(これは、当初、1982年に出版された)に記載される。このような標識は、オリゴプライマー、または合成に使用される基質(すなわち、dNTPまたはddNTPヌクレオチド)に存在し得る。シグナル生成部分は、蛍光標識化プライマーの使用によって例示されるように、直接作用し得るか(Beckら、Nucleic Acids Res. 1989, 17: 5115-5123)、またはビオチン標識したプライマーの使用によって例示されるように間接的に作用し得る(Ansorgeら、J. Biochem. Biophys. Methods 1986, 13: 315-323および)、さらに、ビオチン化ヌクレオチドは、限定されたプライマー伸長の間に取り込まれ得る(Sequenase images™ Protocol Book 1993 United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio)。前述の4つの文獻を、本明細書中で参考として援用する。限定された伸長は、ヌクレオチドにおける改変によって生じるバンドシフトの量を増大化するために必要である。

[0011] しかし、プライマー標識は、その位置についての適切な塩基の割り当てにおいて曖昧さを伴う。不適切な鎖終結を生じ得るテンプレート鎖において、二次構造または問題性配列が存在し得るという限定を有する。プライマーの伸長の間の標識化dNTPの取り込みもまた、この限定で苦しむ。この限定は、放射活性または非放射活性標識が使用されるかどうかに関係なく、有効である。

[0012] この限定は、標識の供給源としての鎖終結ヌクレオチド自体の選択によって回避されている。このことは、蛍光性標識化ddNTPについては、米国特許第5,047,519号においてHobbsおよびCucuzzaによって、および米国特許第4,429,9



13

47号においてMiddendorffらによって、そして蛍光アビジンによって検出されるビオチン標識化ddNTPについては、米国特許第4,729,947号においてMiddendorffらによって記載されている。(さらなる参照については、米国特許第5,027,880号;同第5,346,603号;同第5,230,781号;同第5,360,523号;および同第5,171,534号を参照のこと)。開出の7つの特許の各々を、本明細書中に参考として採用する。この方法によって、シグナルは、鎖終結を組み込む際によって作製される。ターミネーターヌクレオチドを組み込まずに鎖結されている鎖の存在は、現在無関係である。なぜならそれらは、シグナルを生成し得ないからである。しかし、この方法は、シグナル生成を提供するさらなる化学基の存在が、標識化ターミネーターヌクレオチドの取り込みに関するポリメラーゼについての立体的または他の阻害性問題を生じ、それにより、反応の効率を減少するという制限を有する(Proberら、米国特許第5,332,666号、本明細書中に採用される)。ビオチン化ジデオキシヌクレオチドは、シグナル生成を提供するのに使用され得るが、これらの改変ターミネーターは、それらの蛍光化対応物として同じ限定を共有する(すなわち、最も一般的に使用されるポリメラーゼによる取り込みにおける困難)ことを示唆されている(S. Beck 1990 *Methods in Enzymology* 184:611、また、本明細書中で採用する)。取り込みのこの非効率についてのいくつかの代償は、反応におけるポリメラーゼの量を増加させること、および/またはコピーされるテンプレートDNAの量を増加させることによって達成され得る。これらの代償の工程は、高価な酵素(DNAポリメラーゼ)のより高い量、または高品質のテンプレートの適切な量の調製に関連して増加する費用の制限を受ける。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、核酸増幅、核酸配列決定、および重要な特徴(例えば、低減した熱力学的安定性)を有する独特の核酸の生成に有用かつ応用可能である新規のプロセスを提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、特定の核酸配列を直接的に増幅するためのプロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：該特定の核酸配列、初期プライマーまたは核酸構築物であって、以下の2つのセグメント：(A)第1のセグメントであって、(i)該特定の核酸配列に第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および(B)第2のセグメントであって、(i)該第1のセグメントに実質的に非同義であり、(ii)該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同義

特開2000-37194

14

であり、(iii)該第2のセグメントの相補的な配列に結合し得、そして(iv)第2のプライマー伸長が生成され、そして第1のプライマー伸長を置換するように、均衡(isostatic)または限定サイクリング条件下で、第2のプライマーまたは核酸構築物の第1のセグメントの、続く該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメントを含む、初期プライマーまたは核酸構築物；ならびに、基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素；を提供する工程；ならびに、均衡または限定サイクリング条件下で該基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を直接的に増幅する工程、を包含する。

【0015】1つの実施態様では、上記初期プライマーまたは核酸構築物と上記第2のプライマーまたは核酸構築物とは同じであり得る。

【0016】1つの実施態様では、上記初期プライマーまたは核酸構築物と上記第2のプライマーまたは核酸構築物とは異なり得る。

【0017】1つの実施態様では、上記第1のセグメントもしくは該第2のセグメントもしくは上記プライマー伸長、または前述の任意のものは、少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。

【0018】1つの実施態様では、上記第2のセグメントは、上記プライマー伸長においてその相補体に対する上記第1のセグメントの熱力学的安定性を増加する少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。

【0019】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログはインターカレート剤を含み得る。

【0020】1つの実施態様では、上記第1のセグメントまたは上記プライマー伸長あるいはその両方は、少なくとも1つ改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。

【0021】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、その相補体に対する上記第1のセグメントまたは上記プライマー伸長の熱力学的安定性を減少させ得る。

【0022】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、負に荷電した化学基を含み得る。

【0023】1つの好ましい実施態様では、上記負に荷電した化学基はカルボン酸を含み得る。

【0024】1つの実施態様では、上記初期プライマーもしくは核酸構築物、または上記第2のプライマーもしくは核酸構築物、あるいはその両方は、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、あるいは

15

任意の前述の組み合わせを含み得る。

【0025】本発明はまた、特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：該特定の核酸配列、該特定の核酸配列についての第1の初期プライマーまたは核酸構築物であって、該第1の初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント：(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii) テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および(B) 第2のセグメントであって、(i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、そして(ii) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(iii) 該第2のセグメントの相補的配列に結合し得、そして(iv) 第2のプライマー伸長が生成されて第1のプライマー伸長を置換するように、均衡または限定サイクリング条件下で、続く第2のプライマーまたは核酸構築物の第1のセグメントの、該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメント、を含む；ならびに、該特定の核酸配列の相補体に対する続く初期プライマーまたは核酸構築物であって、該続く初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント、(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii) テンプレート依存性の第1の伸長をし得る、セグメント、および(B) 第2のセグメントであって、(i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、(ii) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(iii) 該第2のセグメントの相補的配列に結合し得、そして(iv) 第2のプライマー伸長が生成され、そして第1のプライマー伸長を置換するように、均衡または限定サイクリング条件下で、続くプライマーの第1のセグメントの、該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメント、を含む；ならびに基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素；を提供する工程；ならびに均衡または限定サイクリング条件下で、該基質、緩衝液、またはテンプレート依存性重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非線形に増幅する、工程、を含むする。

【0026】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物と上記第2の初期プライマーまたは核酸構築物とは同じであり得る。

【0027】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物と上記第2の初期プライマーまたは核酸構築物とは異なり得る。

【0028】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物の上記第1のセグメントまたは上記第2のセグメント、上記第2の初期プライマーまたは核酸構築物の上記第1のセグメントまたは上記第2の

(9)

10

20

30

40

50

特開2000-37194

16

セグメント、および上記プライマー伸長、または前述の任意のものからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み、

【0029】1つの好ましい実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは上記第2の初期プライマーまたはその両方の上記第2のセグメントは、上記プライマー伸長における上記第1のセグメントのその相補体に対する熱力学的安定性を増加させる少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。

【0030】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログはインターカレート剤を含み得る。

【0031】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーの上記第1のセグメント、または上記第2の初期プライマーの上記第1のセグメント、またはその両方、またはそれらのプライマー伸長、またはそれらの任意の組合せは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。

【0032】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、上記第1のセグメントまたは上記プライマー伸長、またはその両方の、その相補体に対する熱力学的安定性を減少させる得る。

【0033】1つのさらに好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、負に荷電した化学基を含み得る。

【0034】1つのさらにまた好ましい実施態様では、上記負に荷電した化学基は、カルボン酸を含み得る。

【0035】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいは上記第2の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいはその両方が、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸およびペプチド-核酸、または前述の任意のものの組合せからなる群から選択される核酸を含み得る。

【0036】本発明はさらにまた、特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：該特定の核酸配列およびその相補体；該特定の核酸配列のための第1の初期プライマーまたは核酸構築物、ここで該第1の初期プライマーまたは核酸構築物が、以下の2つのセグメント：(A) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii) テンプレート依存性の第1の伸長が可能であるセグメント、および(B) 第2のセグメントであって、(i) 該第1のセグメントに実質的に非同一であり、(ii) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一であり、(iii) 該第2のセグメントの相補的な配列へ結合し得、そして(iv) 第2のプライマー伸長が生成されて第1の

(10)

特開2000-37194

17

のプライマー伸長を置換するような、均衡または限定サイクリング条件下で、続く第1のプライマーの第1のセグメントの該特定の核酸配列の該第1の部分への結合を提供し得る、セグメントを含む；および該第1のプライマー伸長に対して相補的な第2の初期プライマーまたは核酸構築物、ここで該第2の初期プライマーまたは核酸構築物が、均衡または限定サイクリング条件下で、テンプレート依存性の伸長をし得ることを特徴とするセグメントを含む；ならびに基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素；を提供する工程、均衡または限定サイクリング条件下で、該基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および上記新規プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非直線的に増幅する工程、を包含する。

【0037】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物の上記第1のセグメントまたは上記第2のセグメント、上記第2の初期プライマーまたは核酸構築物の該セグメント、および該プライマー伸長、または前述の任意のものからなる群から選択される少なくとも1つのメンバーは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む得る。

【0038】1つの好ましい実施態様では、上記第1の初期プライマーの上記第2のセグメントは、上記プライマー伸長において上記第1のセグメントのその相補体に対する熱力学的安定性を増加させる少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む得る。

【0039】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、インターカレート剤を含む得る。

【0040】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーの上記第1のセグメントまたは上記第2の初期プライマーの上記セグメント、またはその両方、またはそれらのプライマー伸長、またはそれらの任意の組合せは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む得る。

【0041】1つの好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、上記第1のセグメントまたは上記プライマー伸長、またはその両方の、その相補体に対する熱力学的安定性を減少させ得る。

【0042】1つのさらに好ましい実施態様では、上記改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、真に荷電した化学基を含む得る。

【0043】1つのさらに好ましい実施態様では、上記負に荷電した化学基は、カルボン酸を含む得る。

【0044】1つの実施態様では、上記第1の初期プライマーまたは核酸構築物、あるいは上記第2の初期プ

18

ライマーまたは核酸構築物、あるいはその両方は、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸およびペプチド-核酸、または前述の任意のものからなる群から選択される核酸を含む得る。

【0045】本発明はさらに、特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：該特定の核酸配列；非直線的な増幅が可能なる単一のプライマーまたは単一の核酸構築物であって、以下の3つのセグメント：(a) 第1のセグメントであって、(i) 該特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii) テンプレート依存性の第1の伸長が可能である、セグメント；(b) 該特定の核酸配列の第2の部分に実質的に同一である第2のセグメント；および(c) 該第1のセグメントに実質的に同一である第3のセグメント；を含み、ここで、上記第1のプライマー伸長は該第2のセグメントにハイブリダイズし得、そして該第3のセグメントに対する相補体を生成するように自己プライミングおよび自己伸長し得る配列を生成し得る、および基質、緩衝液、およびテンプレート依存性の重合化酵素；を提供する工程、ならびに該基質、緩衝液およびテンプレート依存性の重合化酵素の存在下で、該特定の核酸配列および該プライマーまたは核酸構築物をインキュベートし；それにより、該特定の核酸配列を非直線的に増幅する工程、を包含する。

【0046】1つの実施態様では、上記プロセスは、均衡条件、限定サイクリング条件、および完全なサイクリング条件からなる群から選択される条件下で行われ得る。

【0047】1つの実施態様では、上記第1のセグメント、上記第2のセグメント、上記第3のセグメント、上記第1のプライマー伸長、上記第2のプライマー伸長、または前述の任意のものからなる群から選択されるメンバーは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む得る。

【0048】1つの実施態様では、上記単一プライマーまたは核酸構築物は、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、または前述の任意のものからなる群から選択される核酸を含む得る。

【0049】1つの実施態様では、上記第1のセグメント、上記第2のセグメント、上記第3のセグメント、上記第1のプライマー伸長および上記自己プライミング伸長、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択されるメンバーは、少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む得る。

【0050】1つの実施態様では、上記第1のプライマー伸長は、限定された基質条件、限定された伸長持続時間、またはその両方からなる群から選択される条件下で行われ得る。

【0051】1つの好ましい実施態様では、上記特定の核酸配列は、1本鎖または2本鎖の形態であり得る。

(11)

特開2000-37194

19

20

【0052】1つの好ましい実施態様では、上記特定の核酸配列は、フラグメント中に見出されるかまたは含まれている。

【0053】1つのより好ましい実施態様では、上記フラグメントは、物理的手段、化学的手段、物理化学的（physico-chemical）手段、および酵素的手段、またはそれらの組合せからなる群から選択される手段によって生成され得る。

【0054】1つのさらに好ましい実施態様では、上記物理的手段は、超音波処理および加熱、またはその両方からなる群から選択され得る。

【0055】1つのさらにまた好ましい実施態様では、上記化学的手段は酸処理を含み得る。

【0056】1つのよりさらに好ましい実施態様では、上記酵素的手段は、ヌクレアーゼおよび制限酵素によってまたはそれらを用いて行われ得る。

【0057】1つのよりさらに好ましい実施態様では、上記ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼを含み得る。

【0058】本発明はさらにまた、核酸の配列決定のための終結機製造プロセスを提供する。このプロセスは、以下の工程：タグ化されていないまたは標識されていない基質、タグ化されていないまたは標識されていないプライマー、重合酵素、緩衝液、およびそれぞれのヌクレオチド塩基についての適切なタグ化されていないまたは標識されていないターミネーターの存在下で、目的の該核酸配列に対応する核酸フラグメントを生成する工程であって、ここで、該ターミネーターのそれぞれは、内部配列が該タグ化分子に対して実質的に非反応性であり、そして該化学反応が媒体またはマトリックス中で該フラグメントの分離を実質的に妨げないような条件下で、タグ化分子と共有結合する化学的な反応基を含む工程；媒体またはマトリックス中で生成された該フラグメントを分離する工程；および該媒体またはマトリックス中で該タグ化分子を抽出することによって該分離されたフラグメントを抽出する工程、を包含する。

【0059】1つの実施態様では、上記生成工程の、上記ターミネーターの上記化学的反應基は、生成されそして任意のタグ化分子に共有結合する前に脱保護された上記フラグメントへの酵素的取り込み前に保護され得る。

【0060】1つの実施態様では、上記生成工程の、上記化学的反應基は、塩素、硫黄または酸素原子を含み得る。

【0061】1つの実施態様では、上記ターミネーターの上記化学的反應基は、異なり得る。

【0062】1つの実施態様では、上記ターミネーターの上記化学的反應基は、同じであり得る。

【0063】1つの実施態様では、上記生成工程の、上記タグ化分子は、それぞれのターミネーターと同じであり得る。

【0064】1つの実施態様では、上記生成工程の、上

記タグされた分子は、それぞれのターミネーターと異なり得る。

【0065】1つの実施態様では、上記タグ化分子は、蛍光色素、化学発光色素、赤外色素、化学発光実体および電気化学発光実体、またはそれらの組合せからなる群から選択され得る。

【0066】1つの実施態様では、上記分離工程は、電気泳動的に行われ得る。

【0067】1つの実施態様では、上記分離工程の上記媒体またはマトリックスは、ゲルを含み得る。

【0068】1つの実施態様では、上記ゲルは、ポリアクリルアミドゲルを含み得る。

【0069】1つの実施態様では、上記分離工程は、キャピラリーゲル電気泳動によって行われ得る。

【0070】1つの実施態様では、上記検出工程は、光度測定、分光光度測定、比色定量測定、蛍光定量測定、連続蛍光測定および化学発光測定、またはそれらの組合せから選択される手段によって行われ得る。

【0071】本発明はまた、相補的な配列に対する減少した熱力学的安定性を有する核酸配列を生成するプロセスを提供する。このプロセスは、真に荷電した化学部分を有する少なくとも1つの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを、該生成された核酸配列へと組み込む工程を包含する。

【0072】本発明はさらにまた、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびベプチド-核酸、または前述の任意のものの組合せからなる群から選択される1本鎖または2本鎖の核酸ポリマーを提供する。ここでこの核酸ポリマーは、1つまたは両方の鎖において1つの真に荷電した化学部分を含む少なくとも1つのプリンまたはピリミジン塩基を含む。

【0073】本発明は、特定の核酸配列を直線的に増幅するためのプロセスを提供する。最初に、増幅されることが求められている目的の特定の核酸配列、最初のプライマーまたは2つのセグメントを含む核酸構築物が提供される。第1セグメント（A）は独特であり、（i）特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的、および（ii）テンプレート依存性第1伸長が可能であると特徴づけられる。第2セグメント（B）は、以下の4つの事項において独自に特徴づけられる。第1に、これは、（i）第1セグメントと実質的に同一でない。第2に、これは、（ii）特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第3に、第2セグメント（B）は、（iii）第2セグメントの相補配列に結合し得る。第4に、第2セグメント（B）は、（iv）均質または限定サイクル条件下で、第2プライマーの第1セグメントまたは核酸構築物の、特定の核酸配列の第1部分への連続の結合を提供し得る。この方法において、第2プライマー伸長が生成され、そして第1プライマー伸長を置換する。また、この方法において提供されるのは、基質、緩衝

液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素である。この増幅プロセスを行うために、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物を、基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素の存在下で、均質または限定サイクル条件下で、インキュベートする；それにより、この特定の核酸配列が直線的に増幅される。

【0074】本発明はまた、特定の核酸配列を非直線的に増幅するプロセスを提供する。このプロセスにおいて、増幅されることが求められている目的の特定の核酸配列、第1初期プライマーまたは目的の特定の核酸配列のための核酸構築物、後続の初期プライマーまたは目的の特定の核酸配列の相補体に対する核酸構築物、ならびに基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素が提供される。第1初期プライマーまたは核酸構築物は、2つのセグメントを含む。第1セグメント(A)は独特であり、(i)特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能であると特徴づけられる。第2セグメントもまた独特であり、以下の4つの特徴で特徴づけられる。第1に、それは、(i)第1セグメントと実質的に同一でない。第2に、それは、(ii)特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第3に、第2セグメントは、(iii)第2セグメントの相補配列に結合し得る。第4に、第2セグメントは、(iv)均質または限定サイクル条件下で、第2プライマーの第1セグメントまたは核酸構築物の、特定の核酸配列の第1部分への続く結合を提供し得る。この方法において、第1プライマー伸長を置換するために、第2プライマー伸長を生成する。後続の初期プライマーまたはこの特定の核酸配列の相補体に対する核酸構築物はまた、2つのセグメントを含む。第1セグメント(A)は、(i)特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能であると特徴づけられる。第2セグメント(B)は、以下の4つの特徴で独特に特徴づけられる。第1に、第2セグメント(B)は、(i)第1セグメントと実質的に同一でない。第2に、それは、(ii)特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第3に、第2セグメント(B)は、(iii)第2セグメントの相補配列に結合し得る。第4に、それは、(iv)均質または限定サイクル条件下で、後続のプライマーの第1セグメントの、特定の核酸配列の第1部分への後続の結合を提供し得る。このような条件下およびこの方法において、第1プライマー伸長を置換する第2プライマー伸長が生成される。このプロセスを行うために、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物が、基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素の存在下で、均質または限定サイクル条件下で、インキュベートされる；それにより、目的の特定の核酸配列が非直線的に増

幅される。

【0075】また、本発明によって提供されるのは、特定の核酸配列を非直線的に増幅するプロセスである。この非直線的増幅プロセスにおいて、増幅されることが求められている目的の特定の核酸配列およびその相補体が提供される。また、第1初期プライマーまたは特定の核酸配列のための核酸構築物が提供され、この第1初期プライマーまたは核酸構築物は、2つのセグメントを含む。第1セグメント(A)は2つの有用かつ新規の特徴を有する。第1に、それは、(i)特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的である。第2に、第1のセグメントは、(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能である。第2セグメント(B)は、4つの有用かつ新規の特徴を有する。第1に、それは、(i)第1セグメントと実質的に同一でない。第2に第2セグメント(B)は、(ii)特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第3に、それは、(iii)第2セグメントの相補配列に結合し得る。第4に、第2セグメント(B)は、(iv)均質または限定サイクル条件下で、続く第1プライマーの第1セグメントの、特定の核酸配列の第1の部分への続く結合を提供し得る。このような条件下およびこの方法において、第1プライマー伸長を置換する第2プライマー伸長が生成される。また、このプロセスにおいて提供されるのは、第2初期プライマーまたは第1プライマー伸長に相補的な核酸構築物である。第2初期プライマーまたは核酸構築物は、代表的には、均質または限定サイクル条件下で、テンプレート依存性伸長を可能にすることによって特徴づけられる単一のセグメントを含む。適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素もまた提供される。本発明のこのプロセスを行うために、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物が、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素の存在下で、均質または限定サイクル条件下で、インキュベートされる。これらの条件下で行われるこのようなインキュベーションの下で、目的の特定の核酸配列が、非直線的に増幅される。

【0076】本発明はさらに、増幅されることが求められている目的の特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスを提供する。この新規のプロセスにおいて、目的の特定の核酸配列が提供され、各プライマーまたは各核酸構築物は、非直線的増幅され得、そして3つのセグメントを含む。第1セグメント(a)は、(i)特定の核酸配列の第1部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存的に第1伸長し得る。第2セグメント(b)は、特定の核酸配列の第2部分に実質的に同一である。第3セグメント(c)は、第1セグメントに実質的に同一である。第1プライマー伸長は、上記の第2セグメントにハイブリダイズし得る配列を生成し得、そしてまた、第3セグメントに対する相補体を

(13)

特開2000-37184

23

24

生成するように自己プライミングおよび自己伸長し得る。また、提供されるのは、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素である。この増幅プロセスを行うために、特定の核酸配列およびプライマーまたは核酸構築物が、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性ポリマー化酵素の存在下でともにインキュベートされる。目的の特定の核酸配列は、それにより、非直線的に増幅される。

【0077】また、手近に本発明によって提供されるのは、核酸配列決定のための終結後増幅プロセスである。ここで、このプロセスは、未タグ化または未標識化基質、未タグ化または未標識化プライマー、ポリマー化酵素、緩衝液、および各ヌクレオチド塩基についての適切な未タグ化または未標識化ターミネーター、配列が求められている目的の核酸配列に対応する核酸フラグメントの存在下で生成される第1工程を含む。このプロセスにおいて、ターミネーターの各々は、内部配列がタグ化分子に対して実質的に非反応性であり、そして化学反応が、実質的に、媒体またはマトリックスにおけるフラグメントの分離に影響しないような条件下で、タグ化分子に共有結合する化学反応を含む。フラグメントの生成の後、後者は媒体またはマトリックスにおいて分離され、続いて分離されたフラグメントの検出が、媒体またはマトリックスにおけるタグ化分子の検出によって達成される。

【0078】本発明によって提供される別のプロセスは、相補配列に対する熱力学安定性を減少した核酸配列を生成するためのプロセスである。このプロセスにおいて、負に荷電した化学部分を有する少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、生成される核酸配列に取り込まれる。

【0079】本発明の他の局面に加えて、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸またはそれらの任意の組合せからなる群より選択される1本鎖または2本鎖核酸ポリマーが提供される。この核酸ポリマーは、ポリマーの片方または両方の鎖において1つの負に荷電した化学部分を含む少なくとも1つのプリンまたはピリミジン塩基を含む。

【0080】これらのプロセスおよびポリマーの全ては、以下により詳細に記載される。

【0081】

【発明の実施の形態】以下の定義は、本発明および本開示の理解に有用である。

定義

均相条件は、実質的に定常な温度および/または化学条件をいう。

【0082】限定サイクル条件は、使用される最高温度が、そのテンプレートから伸長プライマーを分離するのに必要な温度以下である一連の温度をいう。

【0083】完全なサイクル条件は一連の温度をいい、

ここで、そのテンプレートから伸長プライマーを分離するのに十分な、少なくとも1つの温度が使用される。

【0084】直線的増幅は、核酸の1つの鎖のみの2つ以上のコピーが生成される場合に行われる。

【0085】非直線的増幅は、核酸配列の2つ以上のコピーが、核酸およびその相補体の各鎖から生成される場合に行われる。

【0086】初期プライマーは、伸長されていないプライマーまたはプライマー構築物である。

【0087】複合的なプライマーは、伸長後に合成される配列での二次構造形成に実質的に関与しないプライマーである。

【0088】伸長配列が、プライマーまたはプライマー構築物における任意の配列に実質的に同一でも相補的でもない、テンプレート依存性様式において合成された配列である。

【0089】核酸のセグメントは、上記の他のセグメントの相補体が、上記の第1セグメントの伸長のためのテンプレートとして作用し得る場合に、別のセグメントに実質的に同一である。

【0090】本発明は、a) 自己相補配列を有するか、またはテンプレート依存性伸長後に二次構造を形成し得る少なくとも1つのセグメントを含み、そしてb) 適切な条件下で適切な特定のテンプレートの存在下で、適切な条件下で特定の核酸配列の2つ以上のコピーを生成し得る、新規のプライマーおよび核酸構築物のための組成物および使用法を提供する。

【0091】特定の核酸配列の合成のためのプライマー結合および伸長反応を使用する複増幅の全ての方法は、この配列の2つ以上のコピーが所望される場合、結合部位を再生するか、または新たなプライマー結合部位を合成する必要性を有する。以前に記載されている当該分野の全ての方法において、外側調節因子が、プライマー結合部位を再生または作製するために使用されている。これらの因子としては、PCRによって例示されるような熱変性、3SRによって例示されるようなエンドヌクレアーゼ、およびSDAによって例示されるような制限酵素および改変ヌクレオチドが挙げられている。

【0092】本発明の特定の局面において、新規のプライマーおよび核酸構築物が開示され、これらは、新規のプライマーまたは核酸構築物の少なくとも1つのセグメントが、適切な条件下で二次構造形成し得るという固有の特徴を有する。本発明において、二次構造の形成は、結合部位の再生を提供し得、その結果それらは、上記の外側調節因子のいずれも必要とせずに、新規のプライマーまたは核酸構築物の複数の結合および伸長のために使用され得る。

【0093】先行技術において、非直線的な増幅を達成するために、標的核酸の各相補鎖において、プライマー結合部位の存在が必要である。本発明の特定の局面にお

(14)

特開2000-37194

25

26

いて、二次構造の形成はこの限定を克服し、その結果、片方の核酸鎖にのみ相補的であるが、他方には相補的でなく、しかしなお所望の核酸配列の非直線的増幅を行い得る単一のプライマーが使用される。

【0094】本発明の新規のプライマーおよび核酸構築物は、均面、限定サイクル、または完全サイクル条件下で、単一のプライマーまたは1つより多いプライマーを必要とする、直線的および非直線的な増幅系において使用される。二次構造の形成能は、新規のプライマーまたは核酸構築物における自己相補的配列の存在に起因するか、または新規のプライマーのセグメントまたは核酸構築物に相補的な配列の、テンプレート依存性取り込みに由来し得る。また、これは、既存および台成後の配列の両方にも由来し得る。本発明の新規のプライマーおよび核酸構築物は、単一の断性を有する線状分子、1つより多い極性または分枝核酸を有する構築物であり得る。このような構築物の台成の方法および使用例は、以前に開示されている（米国特許出願第08/749,266号；米国特許第5,462,854号。両方の文書を本明細書中で援用する）。本発明の特定の局面において、新規のプライマーおよび核酸構築物は、少なくとも2つのセグメントを含む；テンプレートに結合し得、そして伸長のためにそれを使用し得る第1セグメント、および目的の標的配列に実質的に同一であり、その結果、第1セグメントの伸長が伸長配列を有する第2セグメントの自己ハイブリダイゼーションによって形成される二次構造の形成を可能にする第2セグメント。本発明の特定の局面において、新規のプライマーおよび核酸構築物は、少なくとも3つのセグメントを含む；上記のように規定された第1および第2セグメント、ならびに自己伸長のための鎖内または構造内テンプレートとして作用し得る第3セグメント。

【0095】セグメントは、共有または非共有のいずれかで互いに結合され得る。共有結合を介してセグメントを結合する手段としては、正常な塩基対のリン酸骨格、1つより多い極性および分枝したDNA構築物を有する構築物が挙げられ得るがこれらに限定されない。これらの構築物を台成するための方法は、米国特許出願第08/749,266号（1996年11月15日出願、その内容を本明細書中で援用する）に記載されている。非共有結合によりセグメントを結合する手段としては、リガンド-レセプター結合および相補的塩基対形成が挙げられ得るがこれに限定されない。セグメントは、互いに隣接し得るか、または互いに空間的に離れ得る。セグメントの配列は、互いに区別され得るか、または互いに実質的もしくは部分的に相補的もしくは同一であり得る。

【0096】有用な二次構造の形成は、本発明の新規のプライマーおよび核酸構築物の設計においてさらなるエレメントによって増強され得る。例えば、伸長依存性二

次構造がより容易に形成されることを可能にし得る二次構造が、本発明の新規のプライマーの配列に導入され得る。補充的なエレメントもまた、適切な二次構造の形成を行なうように反応混合物中に含まれ得る。これらのエレメントとしては、1本鎖結合タンパク質、T4遺伝子32タンパク質、RecAタンパク質、および種々のヘリカーゼのようなタンパク質が挙げられ得るがこれらに限定されない。これらのエレメントとしてはまた、ホルムアミドまたはDMSOのような化学試薬が挙げられ得るがこれらに限定されない。これらのエレメントとしてはまた、核酸配列のTmを上昇させるか低くするかのいずれかの改変ヌクレオチドが挙げられ得るがこれらに限定されない。改変ヌクレオチドは、新規のプライマーおよび核酸構築物に予め存在し得、伸長反応の間に取り込まれ得るかその両方であり得る。

【0097】本発明の種々の新規のプライマーおよび新規の核酸構築物は、以前の系の多くの制限を克服する。当該分野において以前に記載されているザーモサイクラーの使用に依存する方法とは対照的に、本発明の特定の局面は、新たなプライミング現象の前に、鎖分断現象の必要がない。さらに、本発明は、複数の酵素配置、リボヌクレオチド、またはRNA中固相（例えば、3SR、NASBA、およびTMA）の生成に依存する等温系に内在するようなプロモーター配列の存在を必要としない。等温SDA系について記載されているような、経路な改変試薬および補充的制限酵素のいずれも必要ではない。

【0098】また、本発明に含まれるのは、核酸の標識のために使用され得る新規の方法および組成物である。これらは、本発明の種々の局面と組み合わせて使用され得るか、または先行技術に記載される方法と組み合わせて使用され得る。

【0099】本発明は、増幅されるとが求められる目的の特定の核酸配列を直線的に増幅するプロセスを提供する。このようなプロセスは、以下の成分および試薬を提供する工程を含む：目的の特定の核酸配列、2つのセグメントを含む初期プライマーおよび核酸構築物、ならびに適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素。初期プライマーまたは核酸構築物の2つのセグメントは、(A) 2つの規定された特徴を有する第1セグメントを含む。第1に、それは、(i) 特定の核酸配列の第1部分に実質的に相補的であり、そして第2に、それは、(ii) テンプレート依存性第1伸長を可能にする。第2セグメント(B)は、4つの規定された特徴を有する。第1に、第2セグメント(B)は、(i) 第1セグメントに実質的に非同一である。次に、それは(ii) 特定の核酸配列の第2部分に実質的に同一である。第3に、第2セグメント(B)は、(iii) 第2セグメントの相補配列に結合し得る。第4に、この第2セグメントは、(iv) 均面または限定サイク



(15)

特開2000-37194

27

リング条件下で、第2プライマーまたは核酸構築物の第1セグメントの、特定の核酸配列の第1部分への続く結合を提供し得る。そうすることにおいて、第2プライマー伸長が生成され、そしてそれは第1プライマー伸長を置換する。この直線的増幅プロセスの別の重要な工程は、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物を、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素の存在下で、均質または限定サイクリング条件下でインキュベートすることである；それにより、増幅されることが求められる目的の特定の核酸配列が直線的に増幅される。

【0100】記載したばかりのプロセスの他の局面において、初期プライマーまたは核酸構築物と第2プライマーまたは核酸構築物とは、同じであり得るか、または異なり得る。さらに、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、有用には、プロセスの種々の成分またはエレメント（第1セグメント、第2セグメント、またはプライマー伸長産物、またはこの様式のための前述のエレメントのいずれかを含む）に取り込まれ得る。このような改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、有用には、上記の第2セグメントに取り込まれ得る。有用には、第2セグメントに取り込まれる場合、このような改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、プライマー伸長におけるその相補体に対する第1セグメントの熱力学安定性を増加させる。改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、例えば、インターカレート剤を含み得る。

【0101】当業者は、第1セグメントまたはプライマー伸長産物、これらのエレメントの両方が、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得ることを認識する。このような場合において、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、その相補体に対する第1セグメントまたはプライマー伸長産物の熱力学安定性を減少させる。このような熱力学安定性を減少させる改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、例えば、カルボン酸のような負に荷電した化学基を含む。

【0102】核酸形態に関して、初期プライマーまたは核酸構築物あるいは第2プライマーまたは核酸構築物（または両方のプライマーおよび核酸構築物）は、多数の核酸を含み得る。これらは、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびベクター核酸、または前述のいずれかの組合せを含むがこれらに限定されない。直線的増幅のさらなる説明を、すぐ下に記載する。

【0103】（1つのステムループ形成プライマーとの直線的増幅）本発明の1つの局面において、特定の核酸配列の直線的増幅は、均質または限定サイクリング条件下で、少なくとも2つのセグメントを有する新規の単一のプライマーまたは新規の単一の核酸構築物の使用によって行われる。本発明の新規の核酸構築物は、1つより

28

多い極性を有し得るか、またはそれらは分枝DNAであり得る。これらの構築物を合成するための方法は、米国特許出願第08/749,266号（先に引用および本明細書中で援用される）に記載されている。新規のプライマーおよび核酸構築物の第1セグメントは、標的核酸配列に存在する配列に実質的に相補的である配列を含む。新規のプライマーまたは核酸構築物の第2セグメントは、標的核酸に存在する配列に実質的に同一である配列を含む。新規の核酸構築物は、第1セグメントおよび第2セグメントの1つ以上のコピーを有し得る。新規のプライマーまたは核酸構築物のテンプレート依存性伸長は、自己ハイブリダイゼーションによって形成されるステムループ構造、ならびに新規のプライマーまたは核酸構築物を含む配列に同一または相補的でない伸長配列を有する産物を作製し得る。

【0104】この産物は、図1に例示される、連続する一連の以下の工程によって、形成され得る。新規のプライマーまたは核酸構築物のテンプレート依存性伸長は、この新規のプライマーまたは核酸構築物の第2セグメントを含む配列に相補的である伸長部分配列において生成する。これらの自己相補性領域は、テンプレートに結合しまであり得るか、または自己相補性構造を形成し得る。二次構造の形成は、テンプレートからの、伸長した新規のプライマーの第1セグメントの全てまたは一部の除去を提供し得る。このことは、別の初期プライマーが、テンプレートからの新規の第1伸長プライマーの除去の前に、テンプレート配列に結合することを可能にする。テンプレート上の第2プライマーの伸長は、テンプレートからの第1伸長プライマーの置換を導き得る。このことは、伸長プライマーの分離が、別の結合および伸長反応のためのテンプレートの使用の前に急に起こる先行技術とは対照的である。これらの手段によって、単一のテンプレートは、均質条件下で、2つ以上の初期事象を提供し得る。さらに、この方法は、全ての温度が伸長産物およびそのテンプレートのT<sub>m</sub>のものを下回る、限定サイクル条件下で使用され得る。連続するプロセスにおいて、新規の第2伸長プライマーにおける二次構造の形成は、新規の第3プライマーの結合および続く伸長を提供し得る。このようにして、変性条件の非存在下において、本発明の新規のプロセスは、核酸テンプレートの単鎖からの多量プライミング、伸長、および遊離事象を提供し得る。さらに、これらの工程の全ては、均質条件下で、同時および連続的に起こり得る。

【0105】複数の同一の第1セグメントおよび第2セグメントを有する新規の核酸構築物または、図1に示されている同じプロセスによって直線的増幅を行うために使用され得る。この新規の構築物は、潜在的に、1つの極性を有する線状構築物と比較して、効率の増加に意まれている。構築物分子の第1セグメントの1つの結合および伸長は、再生されたプライマー結合部位に結合し得



る複製物の他の第1セグメントの局在化高濃度を生じる。複製物のプライミングおよび伸長反応の後、1本鎖である複合DNAの複製のコピーを含む複製物が作製される。

【0106】新規の伸長プライマーおよび複製構築物の、自己相溶性構造を形成する能力は、適切な条件下で実証され得る。先行技術は、その特徴が短い相溶性オリゴヌクレオチドの会合および解離が、温度、塩条件、塩基含有量、および相溶性配列の長さによって決定される平衡反応として生じることを示している。これらの要因の影響は、J. G. Wechsler ([1991] Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio. 1, 26: 277-259, 本明細書中で採用する) によって概説されている。相溶性DNAの大きな方の鎖は、広範な条件にわたって容易に解離しない安定な立体配置における2本鎖分子として存在するが、それらは、鎖間結合の一時的および局在した領域を形成することが周知である。用語「呼吸」は、水素結合のこの局在化領域を説明するために使用されている。パンドローム配列を含む2本鎖DNA分子における二次構造を作製する「呼吸」のための経路は、A. KornbergおよびT. A. Bakerによって、「DNA Replication, 第2版」(1992) W. H. Freeman and Co., NY, NY (その内容を本明細書中で参考として採用する) に記載されている。

【0107】本発明において、上記のように、鎖状2本鎖分子のセグメントの、鎖内ステムループ構造への転移は、プライマー開始反応を、伸長プライマーのそのテンプレートからの分離の前に起こることを可能にし得る。これらの2つの構造の間の平衡は、多数の要因に依存する。第1に、首尾良いプライマー結合のために、鎖的に結合する初期プライマーのセグメントは、反応に使用される濃度で、安定なプライミングが可能であるように適切な長さおよび塩基組成でなければならない。第2に、初期プライマーの伸長後に自己ハイブリダイゼーションに関与するプライマーのセグメントは、適切な長さおよび塩基組成でなければならない。その結果伸長されたプライマーのテンプレートからの部分解離は、十分に安定な二次構造の形成(すなわち、ステムループ構造のステム)を可能にし得る。

【0108】これらの反応に適切な温度は、伸長プライマーのそのテンプレートからの分離に必要な温度を下回る。均新反応において、単一の温度が、結合、伸長、および二次構造形成に使用され得る。または所望される場合、これらの事象を最適化するために異なる温度が使用される。限定サイクル条件が使用され得る。限定サイクルのための異なる温度の使用は、プライマー結合、プライマー伸長、または伸長産物のいくつかのそのテンプレートからの局在化分能に有用であり得る。これらの工程のいずれかおよび全てに使用される温度もまた、反

応において使用される特定のポリメラーゼに適切であるべきである。

【0109】伸長プライマーにおける分子内相溶性領域は、PCR増幅に単一のプライマーの使用を可能にするために、標的核酸の各鎖において同一の結合部位を提供するようにRoseら(米国特許第5,595,891号、同第5,612,199号、両方を本明細書中で採用する)によって以前に利用されている。しかしRoseらによって提供されたすべての例および教示は、次のプライマー結合および伸長反応のためのテンプレートの使用の前にそのテンプレートから伸長プライマーを分離するために、加熱工程(すなわち、サーモサイクラーにおける完全な変性の複数のサイクル)を必要とする。1本鎖RNAでの研究は、ループのサイズが増加するにつれて鎖内ステム形成の減少した機会が存在することを示している(R. L. P. Adamsら、「The Biochemistry of the Nucleic Acids」[1992] Chapman & Hall, London, U. K., 本明細書中で採用する)。なお、Roseらによって提供された、プライマー部位として天然または人工的のいずれかで導入された逆方向反復配列を用いるPCR増幅のための方法は、ステムループ構造のステムを形成する相溶性配列間の100~2,000ヌクレオチド、およびより好ましくは500~10,000塩基の好ましい分離を利用する。このような方向付けは、ステムループ構造の形成が、伸長プライマーの第1セグメントのそのテンプレートからの除去または部分除去を容易にし、伸長プライマーのそのテンプレートからの完全分能を提供する条件の負担を必要とすることなく結合部位を再生し得るのに十分に相溶性配列が近位であるという、本発明に開示される方法および組成物を教示しない。さらに、Roseらによって提供される教示は、等温または限定サイクル条件下での増幅を可能にする手段として、プライマーにおける自己相溶性の使用を除外する。なぜなら、それらの操作範囲は、等温または限定サイクル条件下で、エネルギー的に不利な二次構造形成をなす。安定なステム構造の形成によって生成されるエネルギーの増加は、ステムループ構造のループ部分を形成するためにその相溶性から長鎖を遷移するエネルギーコストによって妥協され、そして上回る。従って、完全サイクル条件は、プライマー結合部位を再生するために必要である。Roseらの教示およびプロセスの帰結は、伸長配列が、常にステムループ構造のループに存在する産物を導くのに対して、本発明のこの局面では、新規のプライマーおよびプロセスの産物は、融化的なステムループ構造の本質的に外側の伸長配列を有する。

【0110】上記の本発明の局面は、鎖強化1本鎖DNAプローブの図試、および核酸の配列の決定のための特定の有用性を見いだす。本発明の開示の前に、1本鎖D

NAプローブを得るために最も一般的に使用された方法は、サーモサイクラーによって、またはRNAプロモーターを含むテンプレートとのRNAポリメラーゼの使用によって提供される複製増殖性事象に依存している。複製増殖性事象に依存するプロセスは、テンプレートの安定性に必要で、試薬および酵素活性の特定の量の損失という制限を課ける。熱安定性ポリメラーゼさえ、安定性条件温度の効果に対して完全に免疫性ではなく、そしてこれらの温度で短々の半減期を有する。このような条件の使用もまた、このような温度によって完全に不活化されるいくつかの酵素の使用を除外する。これらのプロセスはまた、サーモサイクラーの必要性の制限を有する。RNAの生成に依存するプロセスは、プローブに所望される配列に関連してRNAプロモーターを導入する必要性に関連する制限、およびDNAより不安定な産物に本来備わっている制限を受ける。等温または限定サイクル条件の使用について、本発明に開示される方法は、サーモサイクラーを伴うかまたは伴わずに使用され得る。それらは、酵素のより広範なアレイの使用を可能にし、試薬は、程度に不安定な条件に供されず、そして安定な再利用DNAプローブが、最終産物である。

【0111】本発明のこの局面はまた、テンプレートを、均新または限定サイクル条件下で、複数回使用することを可能にすることによって、配列決定に使用され得る。先行技術は、サーモサイクラーにおける複製増殖性事象の使用によって、これを達成し得たのみであった。複製増殖性事象について以前に引用された制限もまた、この使用に適用可能である。さらに、安定性に必要で高温が、配列の正確性を創出し得る熱感導脱プリン化または脱アミノ化率に寄与し得るという、さらなる制限が存在する。テンプレートからの複製回数の配列決定についての本発明の方法の適用は、サーモサイクラーの必要性、酵素の広範なアレイの有用性、およびテンプレートおよび試薬の安定性に対する熱効果の程度から独立しているという利点を提供する。

【0112】本発明はまた、特定の核酸配列を非直線的に増幅するためのプロセスを提供する。非直線的増幅は、以下の成分または試薬を提供する最初の工程を含む：増幅されることが求められる目的の特定の核酸配列、特定の核酸配列のための第1初期プライマーまたは核酸構築物、この特定の核酸配列の相補体に対する続く初期プライマーまたは核酸構築物、ならびに適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素。記載したばかりの第1初期プライマーまたは核酸構築物は、2つのセグメントを含む。第1に、2つの特定された特徴を有する第1セグメント(A)が存在する。それは、(i)この特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能である。第1初期プライマーの第2セグメントは、4つの特定された特徴を有する。第1に、それ

は、(i)第1セグメント(A)と実質的に同一でない。第2に、それは、(ii)特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第2セグメントの第3の特徴は、(iii)第2セグメントの相補配列に結合し得るその能力である。第2セグメントの第4の特徴は、(iv)均新または限定サイクル条件下で、第2プライマーまたは核酸構築物の第1セグメントの、特定の核酸配列の第1部分への続く結合を提供するためのその能力である。このような条件下で、第2プライマー伸長が生成されて、第1プライマー伸長を置換する。

【0113】続く初期プライマーまたは核酸構築物に関して、このエレメントは2つのセグメント、第1セグメント(A)および第2セグメント(B)を含む。第1セグメント(A)は、(i)特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相補的であり、そしてそれは、(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能である。4つの特徴は、第2セグメント(B)を規定する。第1に、第2セグメント(B)は、(i)第1セグメントと実質的に同一でない。第2に、それは、(ii)特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第3に、第2セグメント(B)は、(iii)第2セグメントの相補配列に結合し得る。第2セグメント(B)の第4の特徴は、(iv)均新または限定サイクル条件下で、続くプライマーの第1セグメントの、特定の核酸配列の第1部分への続く結合を提供するその能力である。このような条件下で、第2プライマー伸長が生成され、そしてそれは第1プライマー伸長を置換する。このプロセスの第2工程は、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物を、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素の存在下で、均新または限定サイクル条件下で、インキュベートすることを含む。それにより、目的の特定の核酸配列は、非直線的に増幅される。

【0114】記載したばかりの非直線的増幅プロセスにおいて、第1初期プライマーまたは核酸構築物および第2初期プライマーまたは核酸構築物は、同じであり得るか、または異なり得る。改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、通常、さらなるエレメントとして取り込まれ得る。例えば、これらは、第1初期プライマーまたは核酸構築物の第1セグメントまたは第2セグメント、あるいは第2初期プライマーまたは核酸構築物の第1セグメントまたは第2セグメントに取り込まれ得る。または、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、任意のプライマー伸長物に取り込まれ得る。さらに言えば、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、先行エレメントのいずれかに取り込まれ得るか、または先行エレメントのいずれかを改変するために使用され得る。

【0115】上に記載したばかりのこの非直線的増幅プロセスのさらなる実施形態において、第1初期プライマーまたは第2初期プライマーの第2セグメントは、改変

(18)

特開2000-37194

33

ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得、これはプライマー伸長産物におけるその相隣体に対する第1セグメントの熱力学安定性を増加することを提供する。このような改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、例えば、インターカレート剤を含むか、またはその形態をとる。

【0116】目前にあるプロセスの他の局面において、第1初期プライマーの第1セグメントまたは第2初期プライマーの第1セグメント（または両方）、あるいはプライマー伸長産物（またはさらに言えば前述の要素のいずれかの組合せ）は、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。ここに、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、それらの対応する相隣体に対する第1セグメントまたはプライマー伸長、あるいはその両方の熱力学安定性を減少させることを提供する。このような安定性を減少する改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、カルボン酸のような負に荷電した化学基を含み得る。

【0117】記載したばかりの非直線的増幅プロセスの別の局面は、核酸の型または形態である。ここに、第1初期プライマーもしくは核酸構築物または第2初期プライマーもしくは核酸構築物、あるいはその両方は、任意の数または任意の形態の核酸を含む。このようなメンバーは、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびベプチド-核酸、または前述のいずれかの組合せを含むがこれらに限定されない。

【0118】別の有意な非直線的増幅プロセスが本発明によって提供される。このプロセスは、特定の核酸配列を非直線的に増幅し、そして以下の成分および試薬を提供する第1工程を含む：特定の核酸配列およびその相隣体；特定の核酸配列のための第1初期プライマーまたは核酸構築物、第1プライマー伸長に相隣的な第2初期プライマーまたは核酸構築物、ならびに適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素。第1初期プライマーまたは核酸構築物は、2つのセグメントを含む：第1セグメント（A）および第2セグメント（B）。前者に関して、2つの特徴がそれを規定する。第1に、それは、（i）特定の核酸配列の第1の部分に実質的に相隣的であり、そして第2に、それは、（i）

（i）テンプレート依存性第1伸長が可能である。第2セグメント（B）に関して、4つの特徴がこのエレメントを規定する。第1に、それは、（i）第1セグメントと実質的に同一でない。第2に、それは、（ii）特定の核酸配列の第2部分と実質的に同一である。第2セグメント（B）の第3の特徴は、（iii）第2セグメントの核酸配列に結合し得るその能力である。第2セグメント（B）の第4の特徴は、（iv）均密または限定サイクリング条件下で、続く第1プライマーの第1セグメントの、特定の核酸配列の第1部分への続く結合を提供するためのその能力である。このような条件下で、第2ブ

34

ライマー伸長が生成され、そしてそれが第1プライマー伸長を置換する。第2初期プライマーまたは核酸構築物は、均密または限定サイクリング条件下で、テンプレート依存性伸長についてのその能力によって特徴づけられるセグメントを含む。このプロセスの重要な工程は、もちろん、特定の核酸配列および新規のプライマーまたは核酸構築物を、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合酵素の存在下で、均密または限定サイクリング条件下でインキュベートする工程である。

【0119】他の局面または特徴は、非直線的増幅のために、後記のプロセスに取り込まれ得る。1つの重要な特徴は、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含有させることである。例えば、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが取り込まれ得るか、またはプロセスにおける以下のメンバーエレメントのいずれかを改変するために使用され得る：第1初期プライマーまたは核酸構築物の第1セグメントまたは第2セグメント、第2初期プライマーまたは核酸構築物のセグメント、プライマー伸長、あるいは、前述のいずれかまたは前述のいずれかの組合せ。一様に重要なことは、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを第1初期プライマーの第2セグメントに含有させることである。このような改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含有させることは、プライマー伸長におけるその相隣体に対する第1セグメントの熱力学安定性を増加させることを提供する。改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、当該分野で周知であり、そして例えば、インターカレート剤を含む。

【0120】さらに、第1初期プライマーの第1セグメントまたは第2初期プライマーのセグメント（または両方）、あるいは、それらのプライマー伸長（または、さらに言えば、前述のいずれかの組合せ）は、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログで改変されるかまたは取り込まれ得る。このような改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、それらのそれぞれの相隣体に対する第1セグメントまたはプライマー伸長（または両方）の熱力学安定性を減少させることを提供する。安定性を減少させることを提供する改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、負に荷電した化学基（例えば、カルボン酸）を含み得る。

【0121】本明に記載される非直線的増幅のための他のプロセスの場合におけるように、核酸の形態または型は変化し得る。第1初期プライマーもしくは核酸構築物、または第2初期プライマーまたは核酸構築物、あるいは両方は、以下のいずれかから選択される核酸を含み得る：直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびベプチド-核酸（または、前述のいずれかの組合せ）。

【0122】本発明はまた、増幅されることが探索される目的の特定の核酸配列を非直線的に増幅するための別のプロセスを提供する。このプロセスは、以下の成分お

(19)

特開2000-37194

35

36

よび試薬を提供する第1工程を含む：目的の特定の核酸配列；非直線的に増幅し得る単一のプライマーまたは単一の核酸構築物、ならびに適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素。この単一のプライマーまたは核酸構築物は、3つのセグメント、(a)、

(b)、および(c)を含む。第1セグメント(a)は、(i)特定の核酸配列の第1部分に実質的に相補的であり、そして(ii)テンプレート依存性第1伸長が可能である。第2セグメント(b)は、特定の核酸配列の第2部分に実質的に同一である。第3セグメント(c)は、第1セグメントに実質的に同一である。第1プライマー伸長は、第2セグメントにハイブリダイズし得る配列を生成し得、そして自己プライミングおよび自己伸長をして、第3セグメントに対する相補体を生ずるその能力によっても特徴づけられる。このプロセスの第1工程に続いて、特定の核酸配列およびプライマーまたは核酸構築物は、適切な基質、緩衝液、およびテンプレート依存性重合化酵素の存在下でインキュベートされる。インキュベーション後、特定の核酸配列は、それにより非直線的に増幅される。

【0123】非直線的増幅について最後に記載されるプロセスについての他の実施態様が、本発明によって提供される。例えば、プロセスは、均熱条件、限定サイクル条件、および完全サイクル条件から選択される条件下で行われ得る。

【0124】さらに、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、プロセスの種々のエレメントの改変において使用され得る。例えば、第1セグメント、第2セグメント、第3セグメント、第1プライマー伸長、第2プライマー伸長のいずれかまたは全ては、少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得るかまたは包含し得る。さらに、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、第1セグメント、第2セグメント、第3セグメント、第1プライマー伸長、および自己プライミング伸長のいずれかまたは全てに取り込まれ得る。

【0125】当業者はまた、単一のプライマーまたは核酸構築物が、多数の核酸形態（例えば、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびベプチド核酸、または前述のいずれかの組合せが挙げられる）を含み得ることを認識する。当業者はさらに、第1プライマー伸長が、種々の条件下（例えば、限定された基質条件、限定された伸長持続時間、またはその両方を含む）で行われ得ることをさらに認識する。

【0126】目的の特定の核酸配列の増幅についての上記のいずれかのプロセス（直線的または非直線的増幅であれ）に関して、特定の核酸配列は、1本鎖または2本鎖形態であり得る。さらに、特定の核酸配列は、フラグメントに見いだされ得るか、または含まれる。このようなフラグメントは、多数の手段によって生成され得、こ

れらの手段としては、物理的手段（超音波処理、加熱、またはその両方）、化学的手段（酸処理）、物理化学的手段、および酵素的手段（ヌクレアーゼ（例えばエンドヌクレアーゼ）および制限酵素）が挙げられる。

【0127】非直線的増幅は、以下にさらに記載される。

【0128】（ステムループ形成プライマーおよび構築物との非直線的増幅）所望の配列の非直線的増幅は、各鎖における結合部位がプライマーまたは核酸構築物によって使用される場合に、行われ得る。本発明の別の局面において、非直線的増幅は、均熱または限定サイクル条件下で、少なくとも1つの上記のプライマーまたは構築物が、第1および第2セグメントを有する新規のプライマーまたは構築物である場合に、行われ得る。本発明の新規の核酸構築物は、1つより多い極性を有し得るか、または分枝DNAであり得る。これらの構築物を合成するためのプロセスは、米国特許出願第08/749,266号（前に引用および本明細書中で援用する）に記載されている。第1および第2セグメントは、以前に定義されている。新規のプライマーまたは核酸構築物の第1セグメントは、標的核酸配列に存在する配列に実質的に相補的である配列を含む。新規のプライマーまたは核酸構築物の第2セグメントは、標的核酸に存在する配列と実質的に同一である配列を含む。

【0129】プライマーが非直線的増幅に使用される場合、一方の鎖における結合部位は、第1および第2セグメントを有する新規のプライマーによって使用され、そして他方の鎖における結合部位は、標準的なプライマーまたは別の新規のプライマーのいずれかによって使用され得る。新規の単一のプライマーは、各鎖における結合部位が実質的に互いに類似する場合に、それ自身によって使用され得る。構築物が非直線的増幅に使用される場合、構築物は、標的核酸の一方の鎖に相補的な1つ以上の第1セグメントおよび他方の鎖に相補的な1つ以上の第1セグメントを含む、新規の構築物である。構築物はまた、一方の鎖に同一である1つ以上の第2セグメントも含み、そして他方の鎖における配列に同一である1つ以上の第2セグメントもまた含み得る。新規の構築物の第1セグメントは、互いに実質的に同一であり得るか、または互いに実質的に異なり得る。新規の構築物の第2セグメントは、互いに実質的に同一であり得るか、または互いに実質的に異なり得る。標準的なプライマー、新規のプライマー、構築物および新規の構築物の組合せもまた、少なくともそれらの1つが第1および第2セグメントを含む限りは、ともに使用され得ることもまた理解される。

【0130】以前に記載されるように、新規のプライマーまたは核酸構築物の結合および伸長は、均熱または限定サイクル条件下で、複数のプライマー結合および伸長率象についてのテンプレートの使用を可能にし得る。新

(20)

特開2000-37194

37

規の結合および伸長事象が生じるので、それらは、以前にそのテンプレートに対して伸長している複製鎖の分離を可能にする。このことは、変性事象に必要ではない第2プライマーまたは複製構築物の結合についてのテンプレートとして使用され得る1本鎖複製鎖の生成を生じる。なぜなら、それらは既に、1本鎖形態であるからである。一方のプライマーが標準的なプライマーであり、そして他方が新規のプライマーである場合、テンプレート依存性結合および伸長の最終産物は、一方の末端において、各鎖のステムループ構造を含む2本鎖分子であり得る。両方のプライマーが新規のプライマーである場合、テンプレート依存性結合および伸長の最終産物は、各末端において、各鎖のステムループ構造を含む2本鎖分子であり得る。構築物が、その各々が一方の鎖または他方に相補的である2つの第1セグメント、および一方の鎖のみに相補的である1つの第2セグメントを含む場合、最終産物は、相補的なステムループ構造を有する単一の分子であり得る。構築物が、その各々が、一方の鎖または他方に相補的である2つの第1セグメントおよび

その各々が、一方の鎖または他方と同一である2つの第2セグメントを含む場合、最終産物は、相補的なステムループ構造の2つの対を有する単一の分子であり得る。【0131】非直線的増幅産物は、均衡または限定条件下で、連続した一連の以下の工程によって、新規のプライマーおよび標準的なプライマーによって合成され得る。新規のプライマーは複製鎖に結合し、そして新規の単一プライマーとの直線的増幅について以前に記載されるのと、同じ一連の伸長、二次構造形成、プライマー結合部位の再生、第2結合、第2伸長、およびテンプレートからの第1伸長プライマーの分離が存在する。新規の伸長プライマーは、他方の新規のプライマーの連続する結合および伸長によって置換されるので、これらの1本鎖産物は標準的なプライマーに結合し得、そしてそれらを伸長させて、完全な2本鎖アンプリコンを作製し得る。この潜在的な一連の事象を、図2に示す。得られる2本鎖構造は一方の鎖において新規のプライマーについてのプライマー結合部位に相補的な配列と、および他方の鎖において新規のプライマーについてのプライマー結合部位に同一の配列とを有する各鎖自己相補配列を含む。この結果として、各鎖は、アンプリコンの一方の末端で、ステムループ構造を形成し得る。次いで、1本鎖ループ構造におけるプライマー結合部位の露出は、図1において以前に示した同じプロセスによって、さらなる一連のプライマー結合および置換反応をもたらす。それにより均衡または限定サイクル条件下で、目的の配列の非直線的増幅の生成を可能にする。この産物は、非直線的増幅によって、Roseらによって作製されたものとは異なる。なぜなら、それらのプロセスは、伸長配列が自己相補領域間に常に位置するように導くものに対して、本発明のこの局面において、伸長配列は、ステムループ

38

領域の外側にあるからである。さらに、本発明のこの局面のプロセスは、二次構造情報によって結合部位を再生するのに対して、Roseらにおいては、結合部位は潜在的なステムループ構造のステム領域に存在し、そして増幅産物の変性なしでは別の結合事象には決して利用可能ではない。

【0132】本発明のこの局面を行うのに適切なプライマー配列は、直線的増幅について以前に記載された因子に依存する。潜在的に結合するプライマーのセグメントは、反応に使用される温度で安定なプライミングを可能にするために、適切な長さおよび塩基組成のものでなければならない。プライマーの伸長後の自己ハイブリダイゼーションに関与するプライマーのセグメントは、テンプレートからの伸長プライマーの部分解離が、安定な二次構造（すなわち、ステムループ構造のステム）の作製に十分である適切な長さおよび塩基組成でなければならない。この構造は、恒久でなくても良いが、別のプライミング事象を可能にし得るのに充分安定でなければならない。さらに、本発明のこの局面は、新規の伸長プライマーのステムループ配列の相補的コピーの作製を含む。このことは、プライマーの伸長後の自己ハイブリダイゼーションに関与するプライマーのセグメントが、二次構造に関与する配列がテンプレートとして使用され得るように適切な長さおよび塩基組成のものでなければならないことを必要とする。塩基組成および長さに加えて、一次および二次構造の安定性は、プライマー、伸長配列、またはその両方への改変塩基の取り込みによって影響され得る。これらは、それらが存在するセグメントのTmを、上昇または低下させ得る。セグメントのTmを上昇させ得る塩基の改変の例は、EN2-XXに記載されるようなエチジウムブロマイド部分の添加であり得るがこれに限定されない。セグメントのTmを低下させ得る塩基の改変の例は、Auerら（1996, Nucl. Acids Res. 24:5021-5025, 内容は本明細書中で既に引用されている）によって記載されるような、イノシンの使用であり得るがこれに限定されない。

【0133】非直線的増幅産物はまた、均衡または限定サイクル条件下で、2つの第1セグメントおよび1つの第2セグメントを含む新規の複製構築物によって合成され得る。第1セグメントの各々は、複製鎖またはその相補体に相補的であり、そして第2セグメントは、第1セグメントの1つの伸長後に、二次構造を形成し得る。この構築物は、一対の相補的な潜在的ステムループ構造を有する産物を作製し得る。この産物は、連続する一連の以下の工程によって形成され得る。新規の構築物の1つの第1セグメントおよび1つの第2セグメントは、新規の単一プライマーによる直線的増幅について以前に記載されているのと同様の連続する一連の結合、伸長、二次構造形成、プライマー結合部位の再生、第2結合、第

(21)

特開2000-37194

39

40

2伸長、および鎖分離工程を行い得る。さらに、この合成の産物は、一直の結合および伸長工程のためのテンプレートとして、新規のプライマーおよび標準的なプライマーでの非直線的増幅について上に記載されているような他方の第1セグメントによって使用され得る。これらの工程が作製し得る潜在的な一連の異なる形態は、図3および4に与えられる。この新規の構築物が潜在的に行い得る一連の事象は、以前に記載されたのと同じであり、そして図4に示される最終産物は、ともに結合したプライマーの2つの5'末端を有する図2の最終産物の位相的等価体である。

【0134】非直線的増幅産物は、鎖的複製の異なる鎖に相補的な2つの新規のプライマーの使用によって、連続する一連の以下の工程によって、均質または限定サイクル条件下で合成され得る。新規のプライマー(A)は、鎖的鎖に結合し、そして新規の単一プライマーでの直線的増幅について以前に記載されたのと同様の一連の伸長、二次構造形成、プライマー結合部位の再生、第2結合、第2伸長、伸長プライマーのテンプレートからの分離が存在する。新規の伸長プライマーは、他の新規のプライマーの結合および伸長と置き換えられるので、これらの1本鎖産物は、新規のプライマー(B)と結合し得る。そして伸長させて完全な2本鎖アンブリコンを作製することとを可能にする。この潜在的な一連の事象は、図5に示される。以前に記載したように、伸長して置換したプライマーの相補体の形成は、均質または限定サイクル条件下で、複数の結合、伸長、および置換事象を可能にするべき二次構造を有するテンプレートを作製する。新規の第1プライマーおよびその相補体から導かれる配列に由来する一方の末端での二次構造、および新規の第2プライマーおよびその相補体によって導かれる配列に由来する他方の末端での二次構造を有する産物が形成され得る。この構造は、プライマー結合部位として使用され得る1本鎖セグメントを再生する各鎖において、ループ構造を有するので、新規のプライマーまたは複製構築物のさらなる結合および伸長が、均質または限定サイクル条件下で、いずれかの鎖において開始され得る。例示するために、図5に示される一連の事象は、新規のプライマー(A)による一方の末端での最初の鎖化事象の結果であるが、相補的なテンプレート鎖の利用可能性とともに、一連の事象が、新規のプライマー(B)による、相補的な鎖的鎖のプライマー結合部位での最初の開始と、鎖の鎖式で示されている。

【0135】新規のプライマーはまた、第2セグメントはテンプレートとして使用され得ないが、自己ハイブリダイゼーションを介する二次構造形成になお関与し得るように改変され得る。このような改変を誘導するのに使用され得る手段としては、塩基基性部位およびペプチド-核酸の封入が挙げられ得るがこれに限定されない。このようなプライマーの合成の方法は、米国特許出願番号

第08/749,266号(先に引用および既に本明細書中で援用されている)に記載されている。このような新規のプライマーまたはプライマー構築物のテンプレート依存性結合および伸長によって作製され得る産物は、各鎖において一方の末端での単一ステムループおよび他方の末端での1本鎖プライマー結合部位を有し得る2本鎖アンブリコンである。

【0136】この産物は、これらの改変された新規のプライマーによって、連続する一連の以下の工程において合成され得る。第1の一直の潜在的なプライマー結合、伸長、二次構造形成、プライマー結合部位の再生、第2結合、第2伸長、および伸長プライマーのテンプレートからの分離は、新規の単一プライマーでの直線的増幅について以前に記載されたものと同様であり得る。第2の改変した新規のプライマーとの一連の反応は、図6に示される。テンプレートとして使用され得るので、新規の改変プライマーの第2セグメントは、伸長によって作製された配列との第2セグメントの自己ハイブリダイゼーションに対して別の方法で結合する相補鎖を有さず、それにより二次構造のより効果的な形成を可能にする。従って、分子の3'末端でステムループ構造が存在しないとしても、よりさらなるプライミング事象に使用され得るセグメントが十分に曝露される。

【0137】非直線的増幅産物は、均質または限定サイクル条件下で、2つの第1セグメントおよび2つの第2セグメントを含む新規の複製構築物によって形成され得る。第1セグメントの各々は、一方の鎖またはその相補体に実質的に相補的であり、そして第2セグメントの各々は、第1セグメントの1つの伸長後に二次構造を形成し得る。この構築物は、相補的な潜在的なステムおよびループ構造の2つの対を有する産物を形成し得る。この産物は、新規の単一プライマーによる非直線的増幅について以前に記載されているものと同じ連続する一連の結合、伸長、二次構造形成、プライマー結合部位の再生、第2結合、および第2伸長工程を行う。一方の第1セグメントおよび一方の第2セグメントによって合成される。次いで、上記の一連の反応を行うために、このセットの反応の産物は、新規の構築物の他方の第1セグメントおよび第2セグメントによって使用され得る。これらの工程が生成し得る潜在的な一連の異なる形態は、図7および8に与えられる。この新規の構築物が潜在的に行われ得る一連の事象は、以前に記載されたものと同様であり、そして図8に示される最終産物は、ともに結合したプライマーの2つの5'末端を有する図6の最終産物の位相的等価体である。1つより多い鎖性を有する新規の構築物が使用されて、等置または限定サイクル条件下で、直線的および非直線的増幅が行われ得る種々の配置が例示されているが、分岐DNAを有する構築物もまた、同様のプロセスに使用され得ることが理解される。【0138】上に記載されている本発明の局面の使用の



(22)

特開2000-37194

41

組成物および方法は、以前に記載された技術のいずれの限定も伴わずに、直線的または非直線的増幅を行い得る。本発明のこれらの局面において、先行技術に必要であった、完全サイクル条件、RNA中間体、改変ヌクレオチド、または複数の酵素は必要ではない。

【0139】自己複製する新規のプライマーおよび複製標物 先行技術において記載されている全ての他の増幅系において、2つの結合部位（基質的鎖におけるもの）を必要としない非直線的増幅を開示しているものはない。この必要性は、各鎖からの配列の提示の必要性に起因する。この必要性を伴う系としては、PCRおよびLCRのような温度系ならびに3SRおよびSDAのような等温系が挙げられている。このように、PCR反応は、2つのプライマーで行われ、ここで標的核酸の各鎖は、一方または他方のプライマーによって使用される。Roseらの開示においてさえ、2つの同一な結合部位は、PCRを行うのに必要であり、同じプライマーが各鎖について使用される。

【0140】本発明の1つの局面は、非直線的増幅のための使用の組成物および方法を開示し、ここで新規のプライマーおよび複製標物についての1つ以上の結合部位は、標的核酸の一方の鎖のみに限定される。本発明のこの局面の新規のプライマーおよび新規の複製標物は、少なくとも3つのセグメントを有する。これらのセグメントは、共有または非共有のいずれかでともに結合され得る。共有結合を介してセグメントを結合する手段としては、正常な直鎖状核酸のリン酸骨格、1つより多い極性を有する糖基、および分枝DNA複製物が挙げられ得るがこれらに限定されない。このような複製物の合成の方法は、(INV特許)に記載されている。非共有結合によってセグメントを結合する手段としては、リガンドレセプター結合および相補的増基対形成が挙げられ得るがこれらに限定されない。セグメントは互いに隣接し得るが、または互いに空間的に離れ得る。セグメントの配列は互いに異なり得るが、または互いに相補的もしくは同一であり得る。

【0141】新規の単一プライマーが単一の極性を有する場合、以下の特徴を有する3つのセグメントを有する：

1) 新規のプライマーの第1セグメントは、結合および伸長され得、そして目的の標的の一方の鎖のみに配列に実質的に相補的である配列を含み、その結果、標的に結合し得、そしてテンプレートのような標的配列を用いて伸長され得る。

【0142】2) 新規のプライマーの第2セグメントは、目的の標的における配列に実質的に同一である配列を含み、その結果、第2セグメントは、第1セグメントの標的依存性伸長によって作製される配列と自己ハイブリダイゼーションし得、自己プライミング現象を促進する二次構造を形成することを可能にする。

42

【0143】3) 新規のプライマーの第3セグメントは、隣接テンプレートとして作用し得、そしてそれにより自己伸長を可能にする。

【0144】これらの特徴によって、適切な標的分子の一方の鎖の存在は、新規の単一プライマーを非直線的増幅し得る自己複製核酸に変換し得る。本発明の新規の単一プライマーは、標的に結合し得、そして伸長のためのテンプレートとしてそれを利用する。次いで、第2および第3セグメントの存在に起因して、この産物は、一連の鎖内および鎖間の結合および伸長反応を経験し得る。これらの反応の産物は、自己複製する1本鎖核酸または自己複製する2本鎖核酸である。1本鎖核酸産物は、ステムループ構造を形成し得、そして2本鎖核酸は、1本鎖にされた後、ステムループ構造を形成し得る。

【0145】複製核酸の適切な鎖の存在によって直鎖状の新規のプライマーからこのような形態を合成するのに使用され得る一連の工程は、図9、10、および11に示される。新規のプライマーはテンプレートに結合し得、そして伸長して、図9の工程2の構造を形成し得る。ここで合成は、利用可能なテンプレートのばらばらの部分のみをコピーすることに限定される。合成の限界の制限は、種々の手段によって行われ得る。これらの手段は、サイズ、時間、および基質制限からなり得るがこれらに限定されない。サイズ制限のために、標的は、ランダムまたは部位特異的の末端を作製する手段による伸長の前に処理され得る。ランダムな部位は、選択平均サイズを有するブールを作製するために使用され得る。標的核酸においてランダムな中断を生じるための手段としては、切断のような物理的方法およびヌクレアーゼのような酵素的方法が挙げられ得るがこれらに限定されない。部位特異的の部位は、ばらばらのサイズを有する標的核酸を作製するために使用され得る。部位特異的の末端を作製するための手段としては、制限酵素が挙げられるがこれらに限定されない。時間の調節のために、反応は、結合および合成の所望の長さ、続く温度の調節が反応を停止するのに十分な時間間隔で行われ得る。時間間隔の持続は、緩衝液および塩条件、結合および伸長に使用される温度の選択、正常な基質と比較して異なる効率で使われる改変基質の使用、および特定のポリメラーゼの選択を含み得るがこれらに限定されない要因によって決定される。基質制限のために、プライマー配列が選択され得、その結果伸長反応の所望の限度は、限定された数の特定のヌクレオチドによって行われ得、そして反応から、所望の程度を超える合成をさらに可能にする特定のヌクレオチドを除外する。例えば、反応混合物からのdTTPの除去は、dTTPが必要とされる点で生じる伸長鎖の終結とともに、dCTP、dGTP、およびdATPでのプライマーのテンプレート依存性伸長を可能にする。

【0146】伸長が適切な部位で停止される効率は、反

(23)

特開2000-37194

43

応の全体の効率に影響する。このプロセスについてさらに記載される反応の工程に関与し得る中間体の最大量を生成するために、標的テンプレートが使用されていることを保証するためのできるだけ完全な停止が所望されることが理解される。一方では、制限は全く絶対的である必要はないことに注意されるべきである。いくつかの伸長反応が適切に制限される限りは、以下に記載されるさらなる工程を経験し得る反応産物が作製される。

【0147】プライマーが所望の程度まで伸長された後、プライマーは、そのテンプレートから分離される（図9、工程3）。この図に示されないが、このことは、伸長配列と新規のプライマーの第2セグメント（図9に示される新規のプライマーのa'-b'およびa-bセグメント）との間に自己ハイブリダイゼーションを介する二次構造の形成によって潜在的に起こり得る。このことは、同じ鎖の分子を有する他方の新規の単一プライマーの結合および伸長、続いて、本発明の以前の局面に記載されているような、均質または限定サイクル条件下で、伸長プライマーを置換することを可能にする。しかし、この事象が生じることを可能にする新規のプライマーにおける配列の設計の非存在下で、伸長プライマーのそのテンプレートからの分離は、図9の工程3における温和変性（すなわち、完全サイクル条件）によって行われ得る。それらは、標的または図9に例示されるようなc-d配列と隣接する配列であり、それらは、適切な長さで設計されたx-yのセグメントによってこれらの配列から分離され得るように、a-bについての配列が選択され得る。

【0148】自己触媒または触媒工程のいずれかの後、部分的に伸長したプライマーは、図9の工程4に示されるような相補的セグメントのハイブリダイゼーションによって、自己プライミング事象が可能である。このことは、テンプレートとして新規の単一プライマーの第3のセグメントを用いるプライマーの自己伸長を可能にする。4つのdNTPの限定されたサブセットが、図9の工程2における伸長長さの制御のために使用される場合、欠失ヌクレオチドは、このさらなる伸長工程に付加される必要があり得る。同様に、反応条件における調整もまた、緩衝液、塩、温度、ポリメラーゼ、または改変ヌクレオチドのような要因が、限定された伸長工程についての時間間隔に影響を及ぼすために使用されている場合、必要であり得る。図9の工程5におけるプライマーの第2伸長は、非伸長プライマーの3'末端に相補的である配列を付加する。工程6は、図9の工程5の産物の変性を示す。次いで、伸長プライマーは、鎖内自己ハイブリダイゼーション事象または鎖間ハイブリダイゼーション事象のいずれかを経験する。鎖内自己ハイブリダイゼーションは、伸長末端と、伸長プライマーの第1セグメントまたは第3セグメントのいずれかとの間であり得る。伸長プライマーの第1セグメントとの自己ハイブリ

44

ダイゼーションは、図10の工程7に見られる構造を形成する自己プライミング事象である。この形態は、自己伸長を経験し得る（図10の工程8）。これらの潜在的な鎖内事象による配列の自己複製に加えて、自己複製は、鎖間ハイブリダイゼーションによって起こり得る。新規の初期プライマーの新規の伸長プライマーへの結合は、図10の工程9に示され、続いて、新規の初期プライマーの伸長および新規の伸長プライマーのさらなる伸長は図10の工程10に示される。この図に示されないが、各々の伸長を可能にし得る新規の伸長プライマー間の鎖間ハイブリダイゼーションもまた存在し得る。それゆえ、分子内および分子間アニーリングの両方によって、伸長プライマーは、変性事象後の配列の連続付加を経験し得る。図9および図10に示されるような一連の反応の産物は、与えられた伸長の経路（分子内または分子間）および何回の変性/伸長が行ったかに依存して様々なサイズを有する一連のアンプリコンである。

【0149】本発明の別の局面において、3つのセグメントを有する新規のプライマーが改変され得、その結果、自己プライミングおよび自己伸長が、限定された合成工程および自己複製が分子内結合および伸長によって行われる間にのみ、行われる。このことは、テンプレートとしてその使用を部分的または全体的にブロックするプライマーにおいてセグメントを有することによって行われ得る（図11）。この目的のために新規のプライマーを改変するための方法は、以前に記載されている。伸長テンプレートとしてブロックされる部位の存在は、図9の工程1〜6に示されたのと同じ潜在的な一連の反応をいっそう可能にし得る。しかし、新規の初期プライマーの新規の伸長プライマーとの分子間ハイブリダイゼーション（図11の工程9）の後、非伸長プライマーのみが、その3'末端に付加される新たな配列を有し得るのに対して、以前の伸長プライマーは、同じ長さのままである（図11の工程10）。この事象は、同様に、さらなる伸長事象のためのテンプレートであり得る伸長プライマーのさらなる生成を可能にし、それにより自己複製構築物を作製する。この方法において、1本鎖5'テイルに隣接する2本鎖セグメントを含むばらばらなサイズを有するアンプリコンの非直線的な増幅が存在し得る。

【0150】（自己プライミングヘアピンを有する構築物）自己複製する核酸の、微細核酸の1本鎖からの形成もまた、1つ以上の第1、第2、または第3セグメントを含む核酸構築物によって行われ得る。これらの構築物は、1つより多い極性を有し得るか、または分枝DNAであり得る。本発明のこの局面において、構築物のセグメントは、以下の特徴を有する：

1）1つ以上の第1セグメントは、目的の標的の一方の鎖のみにおいて配列に実質的に相補的であり、その結果、それらは結合し得、そしてテンプレートとして標的配列の上記の鎖のみを用いて伸長され得る。



(24)

特開2000-37194

45

【0151】2) 構築物の1つ以上の第2セグメントは、目的の極性において配列に実質的に同一であり、その結果それらは、構築物の第1セグメントの極的依存性伸長によって作製される配列と自己ハイブリダイゼーションが可能であり、二次構造が、自己ブライミング反応を促進する形態を可能にする。

【0152】3) 構築物の1つ以上の第3セグメントは、鎖内テンプレートとして作用し得、そしてそれにより自己伸長が可能である。

【0153】構築物の第1セグメントは、互いに実質的に同一であり得るか、または互いに実質的に異なり得る。第2および第3セグメントもまた、この方法において記載され得る。配列の種々の配置が、このような構築物に使用され得る。例示の目的で、このような配置の例が、複数の極性を有する構築物について与えられる。本発明のこの局面において、テンプレート依存性結合および伸長、続く鎖内および鎖間結合および伸長の最終産物は、分子内ハイブリダイゼーションによって1つ以上のステムおよび1つ以上のループを形成し得る構築物である。

【0154】自己複製する核酸は、1つの第1、第2、および第3セグメントを有する新規の核酸構築物によって形成され得る。この例において、第2セグメントは、その3'末端自身を有する。なぜなら、それは、1つより多い極性を有する構築物の一部であるからである。しかし、それは、3'末端の障害物に起因して、第2セグメントとしてのみ機能するままである。伸長のこの障害物は、当業者に公知の多数の手段のいずれかによって行われ得る。

【0155】この構築物が適切な極的鎖と接触される場合に起こり得る潜在的な一連の現象は、図12に示される。適切な極的鎖に結合した後、第1セグメントは、限定された伸長を経験し得る。サイズ、時間、および基質制限によって合成の程度を調整する。限定された合成について以前に記載されたのと同じ潜在的な手段もまた、この構築物とのプロセスにおける有用性を見いだす。次いで、伸長鎖は、同じ構築物の第2セグメントとの鎖内結合(工程4a)、または別の構築物分子の第2セグメントとの鎖間結合(工程4b)のいずれかが可能である。これらの配置のいずれかとともに、さらなる伸長は、テンプレートとして第3セグメントを用いることによって起こり得る(工程5aおよび5b)。これらのプロセスのいずれかの産物は、より初期のプライマー構築物の結合および伸長のためのテンプレートとして用いられることによる自己複製し得る伸長構築物である(図12の工程6)。

【0156】自己複製する核酸もまた、2つ以上の第1、第2、および第3セグメントを有する新規の核酸構築物によって形成され得る。構築物の設計に依存して、自己ハイブリダイゼーション現象は、同じ伸長鎖内で生

46

じ得るか、または構築物の異なる伸長鎖間に生じ得る。複数の極性または分枝DNAを有する構築物は、1本鎖を物理的に含むが、明確にするために、構築物における鎖は、単一の極性を有する核酸の連続するストレッチをいう。上記の鎖配置で2つの第1、第2、および第3セグメントを有する構築物の例は、図13および図15に与えられる。本発明のこの局面において使用される構築物は、図9、10、および11に例示された以前の局面に関連する。これらに共通して、合成は、利用可能なテンプレートのばらばらな部分のみをコピーすることに制限される。合成を制限するための以前に記載された同じサイズ、時間、および基質限定はまた、本発明のこれらの局面における有用性を見いだす。それにより、図13および15の工程3は、単一テンプレート分子が、1つのみではなく2つの3'末端の伸長に使用されることを除いて、図9の工程2に等しい。テンプレートからの放出は、構築物における自己ハイブリダイゼーション、続くさらなる鎖伸長を可能にし得る。図13における配置は、構築物内の鎖内結合および伸長を可能にするのに対して、図15においては、構築物内に鎖間結合および伸長が存在する。これらの配置の両方について、構築物の反復セグメントの異なるコピーの使用による、さらなる自己ブライミングおよび自己伸長反応を可能にし得る変性現象が存在し得る。しかし、図14および図16は、非伸長構築物に結合し、そして相互伸長現象を開始することによる自己複製の能力を裏証する一連の現象を例示する。

【0157】図9～16に例示される極的依存性伸長反応の産物は、初期構築物におけるセグメントの特定の配置に依存して異なる。しかし、それらは、一般的な二次構造特徴を共有する。本発明の産物は、1本鎖領域ならびに自己相補的2本鎖領域を構成する分子内形態を有する。これらの1本鎖領域は、ループとして描かれ得る(図9、10、11、13、および14の産物)。それらは、環の一部であり得る(図12の産物)。それらは、2つの2本鎖領域の間に位置する非相補的配列からなる二重の1本鎖ループの一部であり得る(図14および15)。この特徴は、複数の極性を有する以前に記載された構築物の産物(1NV特許)と対照的であり、ここで分子内産物は、自己相補的配列から完全に構成されていた。

【0158】反応を進行するために1つより多い極性を使用している新緑の産物が以前に記載されているが、分枝DNA構築物が、同じ一連の反応および等しい産物に使用され得ることが理解される。また、本発明のこの局面に記載されている1つより多い極性を有する構築物は、(1NV特許)に記載されているものとは異なる。以前に記載された技術において、伸長可能なセグメントは、極的核酸の両方の鎖に相補的であったのに対して、本発明では、全体の反応が、極的核酸の1つであっ

(25)

特開2000-37194

47

て唯一の鎖に相補的であるセグメントのアンプレート依存性プライミングおよび伸長によって行われる。

【0159】(反応の単純化および反応産物)本発明を含む全ての増幅において、反応の間にも起こり得る副反応が存在する。これらは、高分子量産物の複雑な多様性を形成し得る。それらは、所望の配列の合成の効率またはこれらの配列の検出の効率のいずれかを減少する点において有害であり得る。合成の効率の減少は、副反応が、所望の配列の合成の量を、ポリメラーゼおよび基質資源についての競合によって減少する場合に起こり得る。副反応はまた、適切な配列が合成されるが、反応のいくつかの工程に阻害的な二次構造にある場合、効率を減少し得る。このことは、プライマーの結合または伸長のいずれかを妨害する構造によって起こり得る。後者の場合において、プライムされたテンプレートを使用できないことに起因して、そして酵素が結合するが進行し得ない場合のポリメラーゼ活性の欠失にも起因して、効率が失われ得る。不適切な二次構造もまた、適切な配列の検出における問題を生じ得る。

【0160】新規の方法が開示され、これは、これらの二次反応の効果を減少するために使用され得る。これらの方法は、以前に開示されている本発明の種々の局面とともに使用され得、そして他者によって記載されている増幅の方法と組み合わせても使用され得ることが理解される。自己複製する系が、さらなる反応のためのテンプレートとして産物を使用するので、任意の産物の合成の限度は、反応へのターミネーターヌクレオチドの限定された量を含むことによる平均サイズにおける減少によって制御され得る。この方法において、副反応伸長を経験し得ないが、他のプライマーまたはプライマー構築物による伸長のためのテンプレートとして使用され得るままである産物が合成され得る。このことは、合成される適切な配列の量を増加し得、そして潜在的に阻害性のエレメントの量を減少し得る。二次構造の効率的な抑制はまた、二次構造を除去するかまたはこのような構造との全合から標的配列を放出するかまたはこれらの合成後の方法によって行われ得る。前者の方法の例は、二次構造のループおよび結合部を消化する1本鎖特異的ヌクレアーゼで処理され得る。解離は、他のDNA配列から所望のセグメントを単離し得る制限酵素での消化によって行われ得る。除去および解離は、DNaseでの限定消化または熱プリン化のような物理的処理によって同時に行われ得る。次いで、これらの処理の産物は、種々の検出手法によるシグナル生成の点でより効率的にされる。

【0161】(真に高感した改良ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド)本発明の別の局面において、対応する未置換の2本鎖セグメントの塩性程度未満である変性温度を用いる場合に、2本鎖DNA標的の増幅を可能にするヌクレオチドアナログを使用する方法および組成物が開示される。このことは、伸長産物のTmを減少する為

48

に高感した組成物によって改変された塩基の導入によって行われる。以前に記載されるAuerらの教示とは対照的に、本発明の塩基の改変塩基の置換は、結合のための塩度が、未改変塩基とともに一般的に使用される範囲内であることを可能にする。Auerらに記載されたものより低い塩度は、プライマーの核酸標的への結合のためのより低い塩度の使用が、非標的核酸テンプレートでの非特異的プライミングおよび増加したプライマー-ターミネーター形成に寄与し得るということが当該分野で周知であるという限定を有する。本発明は、改変塩基の存在下でより高い結合塩度を使用する能力を保持することによってこれらの限定を回避する。以前に記載された技術において、完全サイクルPCRに使用される最も高い温度と最も低い温度との間の差は、25〜50℃の範囲であり得るのに対して、本発明は、10℃未満の異なる圧縮された一連のサイクルを使用し得る。従って、本発明は、プライマーの効率的な特異的アニーリングを保存するのに十分高い温度の使用を提供する一方、同時に、反応に使用される時間の間、相当なレベルの不活化を可能にする温度への、酵素およびヌクレオチド基質の曝露を回避するのに十分低い温度である。

【0162】(合成後標識)本発明において、配列情報を得るのに以前に使用されている大きなかさ高い基の使用に固有の先行技術の限定を克服する、非放射性シグナルを生成するための新規の組成物および方法が開示される。一般的に、鎖ターミネーターは、ポリメラーゼによって取り込まれる問題を有することが、当該分野で以前から公知である。シグナル生成に有用な大きなかさ高い基の存在が、取り込み効率においてさらなる減少を引き起こすこともまた、長い間公知である。この例は、AMV逆転写酵素およびT7ポリメラーゼによって使用され得るが、ポリメラーゼIのKlenowフラグメントのための基質ではない、蛍光標識化デオキシヌクレオチドの基である(Proberら、1987、Science 238:336-341、内容を本明細書中で使用する)。両方のこれらの要因は、取り込みの全体のレベルを減少し得、これは、順に、終結およびシグナル生成の量を減少する。特に、DNAのより長い鎖は、悪影響を受ける。なぜなら、これらの適任子座の終結は、通常、正常なヌクレオチドに比べて、終結ヌクレオチドの量が減少することによって生じるからである；それにより、それらの取り込みの可能性にさらなる圧力を加げずる。

【0163】本発明において、これらの限定は、鎖伸長および終結事象が完了した後に、ターミネーターヌクレオチドにおける反応基へのシグナル生成成分の共有結合によって克服される。このことは、鎖伸長の前か間のいずれかに標識を取り込む以前の方法とは対照的である。

【0164】本発明のこの局面において、反応基としては、a)内部ヌクレオチドではなく末端ヌクレオチドへ

のシグナリング部分の表裏的に特異的な共有結合を提供するもの、およびb) 改変ターミネーターヌクレオチドの取り込みを實質的に阻害しないか、または電気泳動による分析を妨害しないものが挙げられる。ターミネーターヌクレオチドに付加され得る反応基の例としては、チオール、ハロゲン化アルキル、遮断または保護した一級および二級アミン基が挙げられ得るがこれらに限定されない。反応基を有する誘導体を作製するための方法は、Wardらによって、米国特許第5,476,928号;同第5,241,060号;同第5,260,433号、および同第4,707,440号(先に引用、および既に本明細書中で参考として援用される)に記載されるものであり得るが、これらに限定されない。次いでシグナル生成に有用な基は、酵素活性または基質利用におけるいずれの阻害効果にも関することなく、終結した鎖に結合され得る。検出に有用な基としては、ハプテン、リガンド、レセプター、フルオロセイン(fluorescein)、ローダミン、クマリンおよび他の蛍光分子、赤外蛍光基、化学発光部分、エネルギー移動系、ならびに酵素が挙げられ得るがこれらに限定されない。他の有用な反応基としては、終結ヌクレオチドに取り込まれた場合に、それらを酵素基質としては使用不可能にするかさ高い基または荷電した基が挙げられる。このような基としては、Texas Red、および遅延蛍光のためのドナー結合体が挙げられる。シグナル生成基の反応基への結合のための方法は、Wardらによって、米国特許第5,476,928号において、また米国特許第5,241,060号;同第5,260,433号、および同第4,707,440号(既に本明細書中で援用されている)において記載される。本発明のこの局面は、均質または限定サイクル条件下で、単一テンプレートからの複数のコピーの生成について以前に開示された方法と組み合わせて行われ得る。さらに、ポリマー化後修飾もまた、本発明の開示に対して以前に記載されている任意の手段を用いる場合に行われ得ることが理解される。

[0165]この方法は、HobbsおよびCocuzzaによって、米国特許第5,047,519号(本明細書中で援用する)に記載されるような、シグナル生成の供給源として鎖ターミネーターを用いる本来の説明とは対照的である。これは、本発明とは異なることを指示し、ここで彼らは、「蛍光に基づくDNA配列決定のための鎖終結基質として有用であるために、基質は蛍光標識を含まなければならない。」と明らかにのべている。本発明の方法は、dNTPまたはddNTPのいずれかが、標識化DNA鎖の配列分析の一般的に使用される手段のいずれかにおける取り込みの前に、標識される必要があるという限定を克服する。これらは、終止系およびリアルタイム分析の両方を含み得る。終止系の例としては、アクリルアミドゲル分離、続く写真または化学

発光検出を含むがこれに限定されない。リアルタイム分析の例は、アクリルアミドゲル分離、続くAnsoverら(1986)によって使用されるような1つの色素(または、色素は、Smithら、米国特許第5,171,634号、およびProberら、米国特許第5,332,666号によって記載されるような各種基終結についての異なる色素であり得る)の検出が挙げられ得るがこれに限定されない。前述の刊行物および2つの特許書類の内容を、本明細書中で参考として援用する。本発明は、ジデオキシヌクレオチドによる鎖終結に関して記載されているが、他の鎖ターミネーターもまた使用され得ることもまた理解される。種々の鎖ターミネーターの説明は、A. KornbergおよびT. A. Bakerによる「DNA Replication」第2版(1992, 447-449, W. H. Freeman and CO., NY, NY, 本明細書中で援用される)に与えられる。標識における変化の例としては、アシクロ(acyclo)およびアラビノシル(arabinosyl)dNTPが挙げられ得るがこれらに限定されない。末端ヌクレオチドとして使用される場合、これらの誘導体は、特定の使用のためのものであり得る。なぜなら、化学的および生化学的に、それらは、DNA鎖の他の部分を含む正常なヌクレオチドとは十分に区別されるべきであるからである。蛍光標識化アシクロ誘導体が、放射活性標識によって誘導されるものに等しい配列ラダー(ladder)を生じ得ることもまた、米国特許第5,332,666号(本明細書中で援用される)に示されている。さらに、ターミネーターヌクレオチドの3'位置におけるアミノ基の存在による鎖終結の軽減はまた、シグナル生成部分の合成後の結合のための官能基を提供し得る。鎖の活性な3'-OH末端を再生し得る他のブロック基が使用され得る。例えば、光切断可能(photocleavable)基が含まれる場合、当該分野に記載されるように、反応が終結され、そして標識の結合に使用された後、3'-OHが再生され得る。この機能に使用され得る系としては、蛍光標識化ジデオキシヌクレオチドの末端トランスフェラーゼによる取り込みが挙げられるがこれらに限定されない。

[0166]本発明の別の局面は、適切に終結されているプライマー標識化伸長産物の、終結されていないものからの分離によって、プライマー標識系に固有の限定を克服することに関する。このような分離は、改変ターミネーターヌクレオチドの特性を用いることによって達成され得る。このことは、ターミネーターヌクレオチドに予め存在するマーカー、または上記の合成後改変によって行われ得る。マーカーの存在と非存在との間の適切な物理的分離を可能にし得る任意の手段は、本発明の範囲内であると考えられる。このような予め存在するマーカーの例は、ビオチン、イミノビオチン、フルオレセイ

(27)

特開2000-37194

51

ン、ハロゲン、チオール、およびアミンからなり得るがこれらに限定されない。このようなマーカーを有する鎖を物理的に配列決定する手段は、ハロゲン、チオール、またはアミンに結合するアビジン、ストレプトアビジン抗体、および物理的マトリックスからなり得るがこれらに限定されない。標識化鎖のターミネーターヌクレオチドを欠く鎖からの分離の後、産物は、配列に適切な形態において放出され得る。このような放出のための手段の例は、抗体のようなタンパク質の、加熱または化学処理を介する物理的変性からなるがこれらに限定されない。放出はまた、ジスルフィド架橋またはイミノピオチンのような切断可能な (scissable) 結合の使用によって行われ得る。切断可能な結合の使用の方法は、Ward の開示 (先に引用) に記載される。縮製した鎖からのシグナル生成は、プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドにおいて、またはプライマーに付加されている dNTP もしくは ddNTP ヌクレオチドにおいて、マーカーによって行われ得る。

【0167】本発明のプロセスは、単一のチャンネルおよび4つの異なる色素を使用する手順を含む全ての配列決定手順、ならびに4つのチャンネルおよび1つの色素を使用する手順のために、シグナル生成に適用され得る。このような手順において生成されるシグナルは、定率によってリアルタイムで分析され得る。

【0168】従って、本発明は、核酸配列決定のための、終結後標識プロセスを提供し、これは3つの工程を含む。第1に、目的の核酸配列に対応する核酸フラグメントは、各ヌクレオチド塩基についての、非タグ化または非標識化基質、非タグ化または非標識化プライマー、ポリマー化酵素、緩衝液、および適切な非タグ化または非標識化ターミネーターの存在下で生成される。ターミネーターの各々は、内部配列がタグ化分子に実質的に非反応性であり、そして化学反応が媒体またはマトリックスにおけるフラグメントの分離を実質的に妨害しない条件下で、タグ化分子に共有結合する化学反応基を含む。次に、媒体またはマトリックスにおいて生成されるフラグメントが分離され、続いて、この媒体またはマトリックスにおいてタグ化分子を抽出する手段によって、分離したフラグメントが抽出される。

【0169】種々の実施形態は、上記の終結後標識プロセスに含まれ得る。生成工程において、例えば、ターミネーターの化学反応基は、生成されるフラグメントへのそれらの酵素的取り込みの前に保護され得、次いで任意のタグ化分子に共有結合する前に脱保護され得る。化学反応基は、塩素、硫黄、または酸素原子を含み得る。さらに、上記のターミネーターにおける化学反応基は異なり得るか、または同じであり得る。さらに、タグ化分子は同じであり得るか、または各ターミネーターとは異なり得る。当業者には、このようなタグ化分子が公知であり、そして蛍光色素、化学発光色素、赤外色素、化学発

52

光素、および電子化学発光素、またはそれらの組合せからなる群から選択され得ることが容易に明らかである。

【0170】終結後標識プロセスの記載されたばかりの実施形態および特徴に加えて、分離工程は電気泳動的に行われ得、そして媒体またはマトリックスは、ポリアクリルアミドゲルのようなゲルを含み得る。分離はまた、キャピラリーゲル電気泳動によって行われ得る。

【0171】検出に関して、この工程は、光度測定、分光光度測定、比色測定、蛍光定量測定、逐次蛍光測定、および化学発光測定、またはそれらの組合せから選択される手段によって行われ得る。

【0172】(発明の有用性) 核酸配列の直線的および非直線的増幅を行われ得る。本発明の種々の局面は、等温およびサーモサイクラー依存性方法についての先行技術に記載される方法によって以前に行われている多くの機能を満たし得る。これらとしては、配列決定、プローブ合成および標識、法医学的鑑定、対立遺伝子鑑定、遺伝的スクリーニング、所望の遺伝子の単離およびクローニング、人工遺伝子構築、遺伝子発現、ならびに診断用同定が挙げられ得るがこれらに限定されない。逆転写酵素または逆転写が可能な DNA ポリメラーゼは、両塩基質として RNA 分子を用いて、本発明を実行するために使用され得る。反応は、プライマーまたは試薬の任意の改変の存在下で行われ得るか、あるいは所望であれば、標識または他の改変がなされ得る。増幅した配列の存在は、標識化部分の取り込みまたは直接的検出のいずれかによって直接アッセイされ得る。同定の間接的手段もまた、適切なプローブとのハイブリダイゼーションによって行われ得る。これらの間接的手段としては、ドットプロット、スロットプロット、サザンプロットおよびプレートアッセイ形式が挙げられ得るがこれらに限定されない。

【0173】特定の核酸配列は、テンプレートに結合するプライマーに存在すること、または複数のプライミング事象のための自己相補領域を作製することを必要とするが、さらなる核酸配列は、プライマー配列に含まれて、それらの存在により所望の特性が提供され得る。これらとしては、所望の核酸配列およびアンプリコンの同定または単離に使用される配列のさらなる増幅を可能にするファージ RNA プロモーターが挙げられ得るがこれに限定されない。配列は、各末端で逆方向反復を有するアンプリコンを作製するプライマーまたはプライマー構築物に含まれ得る。次いで、このセグメントは、結合および伸長のためにいずれかの鎖を使用し得る単一プライマーまたはプライマー構築物のための結合部位として使用され得る。挿入された配列の選択は任意であるので、このセグメントは、間の配列とは関係なく増幅に使用され得る普遍的なものであり得る。

【0174】本発明によって提供されるのはまた、相補

(28)

特開2000-37194

53

的配列に対する熱力学的安定性が減少されている核酸配列を生成するためのプロセスである。このプロセスにおいて、負に荷電した化学部分を有する少なくとも1つの改変ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、生成される核酸配列に取り込まれる。

【0175】本発明のさらなる提供は、直鎖状核酸、分枝核酸、逆方向核酸、およびペプチド-核酸、または前述のいずれかの組合せからなる群より選択される1本鎖または2本鎖核酸ポリマーである。核酸ポリマーは、少なくとも1つのプリンまたはピリミジン塩基を含み、これらはポリマーの1つまたは両鎖において、1つの負に荷電した化学部分を含み、

【0176】本発明はさらに、上記の種々のプロセスにおける使用のために組成物およびキットを意図して包含する。

【0177】以下の実施例は、本発明の種々の局面を例示するために示されるが、本明細書下記の請求の範囲においてより詳細に示され、そして規定されるような範囲を限定することを決して意図されない。

【0178】

【実施例】(実施例1) 53℃および63℃でのBstポリメラーゼによるPCR産物の等温増幅)

(i) HBVプラスミドDNAのPCR増幅  
HBVマイクロタイタープレートアッセイ(ENZO Diagnostics, NY, NY)からのHBVポジティブコントロールを、PCRによる増幅のための模範として使用した。製造業者によると、このDNAは80pg/μl(μlにつき1.2×10<sup>7</sup>コピーのHBVと同等)である。1μlのHBV模範、1×PE緩衝液(Perkin-Elmer, Emeryville, CA)、4mMのMgCl<sub>2</sub>、250μMのdNTP、8単位のアンプリサーム(AmpliTherm)(Invitrogen, La Jolla, CA)、ならびに10ピコモルのHBVオリゴプライマーFCおよびRCからなる50μlのPCR反応を実施した。  
FC配列=5'-CATAGCAGCA GGATGA AGAG GAATATGATA GGATGTGTC T GCGGCGTTT-3'  
RC配列=5'-TCCTCTAATT CCAGGA TCAA CAACAACAG AGGTTTTGCA TGGTCCCGTA-3'.

【0179】この実施例において、FCプライマーの3'末端における29塩基、およびRCプライマーの3'末端における30塩基は、テンプレートとしてHBV模範DNAを使用して伸長し得る第1のセグメントである。FCおよびRCプライマーの5'末端における30塩基は、テンプレートとしてHBV DNAを使用して、プライマーの伸長によって合成された最初の30塩基に相補的な第2のセグメントである。熱処理条件は、94℃を1'、56℃を15'、および68℃を30'

54

を30サイクル行った。HBV配列に基づいて、予想されたPCR産物は長さが211bpであるべきである。ステムループ構造は、それぞれ、第2のセグメントおよびその相補体により与えられる30塩基対のステム、ならびにFCおよびRCの第1のセグメントにより与えられる29および30塩基のループを持って、この生成物のそれぞれの末端において起こり得る。

【0180】(i) PCR産物の分析

増幅は、0.5μg/mlの具化エチジウムの存在下で、0.5×TBE緩衝液を用いて流した4%Meta phorアガロースゲル(FMC BioProducts, Rockland, ME)中の100μlのサンプルのゲル電気泳動によってアッセイした。UV照射下で、3つのバンドが出現し、それらはDNAサイズマーカーによる判定で、長さがおよそ210、180、および170bpであった。210bpに対応するバンドは、予想された線状PCR産物であり、そしておそらく他の2つのバンドは、同じサイズのアンプリコンに対応しており、ここで、二次構造が一方または両方のいずれかの末端上で形成され、それによってそれらの効果的な移動度が変化している。

【0181】(i) PCR産物の等温増幅

上記のPCR産物の種々の希釈物5μlは、1×ThermoPol緩衝液(NE Biolabs, Beverly, MA)、200μMのdNTP、20ピコモルの正方向および逆方向プライマー、8単位のBstポリメラーゼ(NE Biolabs, Beverly, MA)からなる100μlの反応混合物中で使用された。正方向プライマーはFCまたはLFCのどちらかであり、逆方向プライマーはRCまたはLRCのどちらかであった。FCおよびRCプライマーの配列は上記に示した。LFCおよびLRCプライマーは、FCおよびRCプライマーだけの第1のセグメントに対応する配列を有している。そのような配列は以下のとおりである：

LFC=5'-GGATGTGTCT GCGGCGT TT-3'

LRC=5'-AGGTTTTGCA TGGTCCC GTA-3'.

【0182】インキュベーションは、30分、180分、もしくは終夜のインキュベーションであった。反応温度は53℃もしくは63℃のどちらかであった。30分反応したものは2%アガロースゲルを用いてゲル電気泳動で分析した；180分反応したものは4%Meta phorアガロースを用いて分析した。

【0183】この分析結果を図17に示す。30分インキュベーションの後に取り出したサンプルの最初の組の中で、PCR産物の10<sup>-1</sup>希釈物だけが53℃でいくらかの合成を示すが、63℃からの反応物は、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>および10<sup>-3</sup>希釈物で合成を示している。これらのデータは、合成量は加えた模範DNAの量に依存すると

いうことを示している。180分の合成の後に取り出されたサンプルの組では、実質的により多くの合成が行われている。これらの反応の生成物は、分離したパターンを形成する一連のバンドである。これは、通常PCRで見られる単一の分離したバンド、またはPCR増幅の後でLCおよびRCプライマーを用いて以前に見られた2つもしくは3つのバンドと対照をなしている。この複数のバンドは、おそらく、アンプリコンをプライマーおよびテンプレートとして機能させる二次増殖の存在に起因し得るか、またはストランドスイッチングの継続であり得る。53℃で3時間インキュベーションした後、標的が少しもないようなコントロールでさえ、実質的な合成の証拠を示している。しかし、標的テンプレートを有するすべての53℃の反応物に見られる、単一の標的依存性パターンが存在し、そして標的なしのコントロールに存在するパターンは実質的に異なることが留意され得る。これはおそらく標的が合成を開始した経路が異なっていることに起因する。63℃でインキュベーションしたものは、全てのテンプレート希釈物で実質的な合成を示し、そして同じパターンが53℃の反応によって生成されることを証明する。しかし、本実施例においては、63℃では、標的非依存性増幅の証拠はない。10<sup>3</sup>の希釈でさえ実質的な量の合成があるということは、この系が実質的な増幅をし得ることを示している。終夜のインキュベーションもまたゲルによって分析され、そして3時間インキュベーションと同じパターンおよび同じ量を示した（データ表示なし）。

【0184】（実施例2）HBV配列の等温増幅の時間経過/感度

#### (i) 増幅

EcoRIであらかじめ消化されたHBVプラスミドDNAを、等温増幅のテンプレートとして使用した。DNA混合物は、FCおよびRCプライマーがそれぞれ40pM、1×ThermoPol緩衝液（N. E. Biolabs, Beverly MA）および4×10<sup>3</sup>、4×10<sup>4</sup>、または0 HBV分子を含む100ulからなる。これらはPerkin-Elmer（Emeryville, CA）製のサーモサイクラーモデル480を使用して5分間で94℃まで熱した。次いで装置を63℃で480分セットした。ブロックを63℃に調節した後、酵素混合物25ulを含有する個々のチューブをサーモサイクラーブロックの中に置いた。それぞれの酵素混合物チューブは、4単位のBst1ポリメラーゼ（N. E. Biolabs, Beverly MA）、1×ThermoPol緩衝液（N. E. Biolabs, Beverly MA）および400uMのdNTPを含有した。DNA混合物、および酵素混合物を63℃に調節した後、25ulのサンプルをそれぞれのDNA混合物から採取し、合計容量がそれぞれ50ulになるようにそれぞれの酵素混合物チューブに加え

た。DNA混合物のそれぞれのチューブ用として、3件のサンプルを採取した。それぞれのDNA濃度用についてひとつのサンプルを、2、4、および8時間後に63℃のブロックの外に取り出した。

#### 【0185】(ii) 増幅のアッセイ

標的依存性増幅と標的非依存性増幅とを区別するために、マイクロタイタープレートアッセイを標的特異的配列の存在を検出するために使用した。このアッセイ用に使用される試薬および説明書は、LCおよびRCプライマーによって作られたアンプリコンに特異的なプレートおよびシングルプローブを置換して、ENZO Diagnostics（Farmingdale, NY）製のHBVマイクロタイタープレートアッセイから得られた。

#### 【0186】(iii) マイクロタイタープレートの調製

プレートを、それぞれにおいて12個の（ダイナ？）ストリップ（製造業者）を有する5個のフレームを使用したパッチプロセスで調製した。これらのプレートに使用した縮短オリゴヌクレオチドの配列は、FCおよびRCプライマーの間にあるHBVの領域に由来し、そして以下のとおり記載される：

5'-CTCATCTTCT TATTGGTTCT  
TCTGGATTATCAAGGTAT-3'.

【0187】それぞれのマイクロタイタープレートのウェルを1M酢酸アンモニウム200ulで2回リンスし、次いで室温で2時間逆さにしておいた。上記縮短オリゴヌクレオチド100uMを含有する溶液10ulを、1M酢酸アンモニウム27.5mlと混合した。この溶液の50ulをそれぞれのウェルに加え、そしてプレートを、1M酢酸アンモニウム入りの開口容量と共にインキュベーター中で37℃で終夜インキュベートした。翌日、それぞれのウェルを1M酢酸アンモニウム200ulで一回洗浄し、およびプレートを終夜乾燥した。次いでストリップは将来使用するために乾燥剤と共にボート中に設置した。

#### 【0188】(iv) プローブの調製

増幅のためのプライマーとして使用されるRCオリゴヌクレオチドは、プレートアッセイのためのシングルプローブとしても使用される。RCオリゴヌクレオチド100uMのテレーリングは、ENZO Diagnostics（Farmingdale, NY）からの末端テレーリングキットの使用によって達成された。テレーリングしたRCオリゴヌクレオチド26ulを、シングルプローブ緩衝液（33%脱イオン化ホルムアミド、5mMのEDTA（pH8.0）、1%Trilon X-100、2.5%デキストラン硫酸、0.15MのNaCl、0.12MのHEPES（遊離酸）、0.01%フェノールレッド）12.8mlと混合した。

【0189】e) 反応物からのサンプルを用いたマイク

ロタイタープレートアッセイの結果を以下に示す：

	2時間	4時間	8時間
1×10 <sup>8</sup> 標的	0.413	1.491	1.419
1×10 <sup>4</sup> 標的	0.203	0.098	1.017
標的なし	0.086	0.085	0.063

上記に見られるように、生成物の量は、初期の標的の量および反応が進行する時間量の間と関係があった。標的がないときに形成された任意の生成物から発生したシグナルもなかった。またこのアッセイでは1.4以上の値は飽和値であり、そして生成物の量は、はるかに大きくなり得る。生成物の全量の評価には、それがアッセイのダイナミックレンジに入るまで生成物を希釈することが要求される。しかし、この実施例の目的のために、これを実行しなかった。上記の増幅反応は、Bstポリメラーゼの使用には依存しない。違う酵素Bcaポリメラーゼ(PanVera, Madison, WI)が置換される場合、実質的な量の合成もプレートアッセイ(データ表示なし)に見られ得る。さらに、Bcl反応の最大温度は63℃であるようであるが、Bcaポリメラーゼが置換された場合、増幅が68℃で達成され得る。それぞれの酵素に添付された文献によると、BstおよびBcaポリメラーゼの最適温度はそれぞれ65℃および70℃である。このことはそれらの最高温度が5℃違うことを説明し得る。

【0180】(実施例3 ΔTthのポリメラーゼでの増幅) BstまたはBcaポリメラーゼの熱不安定性により、両実施例における反応は2つの段階で達成されなければならない。標的DNAの変性は、ポリメラーゼの不存在下で行われ、続いてより低温での平衡の後に酵素が添加された。取り扱う工程を減少させ、およびアンプリコンキャリアーオーバーの投入の機会を減少させるように、初期の段階においてポリメラーゼを含め得ることが所望される。従って、等温増幅を達成するためのTthのポリメラーゼの5'-3'エキソ核酸体の使用を許容する条件が確立された。この特定の実施例において、FJおよびRJと称される2つのプライマーを使用し、これは以下の配列を有していた：

FJ配列=5'-CATAGCAGCA GGATGA AGAG GAATATGATA GCT GGATG TGTCT GCGGCGTTT-3'

RJ配列=5'-TCCTCTAATT CCAGGA TCAA CAACAACCAG TGC AGGTT TTGCA TGGTCCCGTA-3'.

【0191】これらのプライマーのそれぞれは上記のFCおよびFJプライマーと、それらが各々の第1のセグメント中に3つ多いヌクレオチド(上記下線部)を有していることを除いて類似している。反応を1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>4</sup>、または1×10<sup>4</sup>HBV標的分子を用いて設定した。1つの反応物は、HBV DNAの代わりにT7 DNAを50ng含有し、そしてこれを標的なしの

コントロールとして使用した。反応条件は以下のとおりである：2つの相で実施されなければならない等温増幅を制限する；第1の工程は標的分子の94℃の高温変性であった。

【0192】(ΔTthのポリメラーゼでの増幅) BstまたはBcaポリメラーゼの熱不安定性により、両実施例における反応は2つの段階で実施されなければならない。標的DNAの変性を、ポリメラーゼの不存在下で実施し、続いてより低温での平衡の後に酵素を添加した。取り扱う工程を減少させ、およびアンプリコンキャリアーオーバーの投入の機会を減少させるように、初期の段階においてポリメラーゼを含め得ることが所望される。従って、等温増幅を行うためのTthのポリメラーゼの5'-3'エキソ核酸体の使用を許容するように条件が確立された。この特定の実施例において、FJおよびRJと称される2つのプライマーを使用し、これは以下の配列を有していた：

FJ配列=5'-CATAGCAGCA GGATGA AGAG GAATATGATA GCT GGATG TGTCT GCGGCGTTT-3'

RJ配列=5'-TCCTCTAATT CCAGGA TCAA CAACAACCAG TGC AGGTT TTGCA TGGTCCCGTA-3'.

【0193】これらのプライマーのそれぞれは上記のFCおよびFJプライマーと、それらが各々の第1のセグメント中に3つ多いヌクレオチド(上記下線部)をそれぞれ有していることを除いて類似している。等温反応またはPCR反応のいずれかが、50μlの反応容積中で1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>4</sup>、または1×10<sup>4</sup>HBV標的分子と共に行われた。標的なしのコントロールはHBV DNAの代わりに50ngのT7 DNAを含有したのもも含んだ。それぞれの標的濃度は、ΔTthのポリメラーゼ(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)10単位、1×ΔTthのポリメラーゼ緩衝液(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)、250μMのdNTP、2.5mMのMgCl<sub>2</sub>、1×PCRエンハンサー(Epicentre Technologies, Madison, WI) ならびにそれぞれが20ピコモルのFJおよびRJプライマーを含む100μlの反応混合物中で設定した。それぞれの混合物を2つの50μlの部分に分けた。一方の50μlの部分は、94℃までの5分間の加熱、続いてサーモサイクラーの中で68℃で240分間置くことによる等温反応で利用した。他方の部分は、等温反応が終了するまで4



(31)

特開2000-37194

59

60

℃で保持し、そしてサーモサイクラーを用いて、94℃で1分間、そして68℃で45秒間を35サイクル行い、この部分でのPCRを実施した。

【0194】等温反応の程度は、前記実施例で説明したように、ゲル電気泳動およびプレートアッセイによって測定した。プレートアッセイは、T-テイル化プローブが、LFCプライマーに由来することを除いて上記のとおり実施した。各々のこれらの方法に基づく結果を図18に示す。ゲル電気泳動は、等温増幅後に $1 \times 10^4$ および $1 \times 10^5$ の標的反応物について広範な合成を示す。写真ではよく見えないが、ゲルは $1 \times 10^5$ の標的反応物についてより小さなレベルの増幅も示した。PCR反応も同じゲル中で調査した。そして $1 \times 10^4$ および $1 \times 10^5$ の標的反応物について高いレベルの増幅を伴った本質的に類似の結果を示す。これらの条件下では、適切なアンプリコンの合成量とは反対に増加するより小さいアンプリコンを作り出した非特異的反応も見られた。等温反応がプレートアッセイによってアッセイされた場合も、より高いレベルの標的が閾値レベルを示し、そして $1 \times 10^5$ の標的レベルがポジティブな反応を与えると明確に示され得る。ネガティブなコントロールは、2つのアッセイのいずれによってもシグナル発生の徴候を示さないことに留意するべきである。

【0195】(実施例4) 増幅のための単一プライマーの使用)それぞれのサンプルは、 $1 \times \text{Taq}$ 緩衝液(Perkin Elmer, Emeryville, CA)、5mMの $\text{MgCl}_2$ 、200 $\mu\text{M}$ のdNTPs、および5単位のAmplitaq Gold(Perkin Elmer, Emeryville, CA)を含む50 $\mu\text{l}$ の反応物からなつた。それぞれの反応は、以下の配列を有する5 $\mu\text{M}$ のオリゴヌクレオチドプライマーも有している:

5' CCTGCTGCTA TGCCTCATCT G  
ACAAACGGG CAACATACCT CCTG  
CTGCTA TGCCTCATCT-3'。

【0196】単一プライマー増幅は、標的DNA(実施例1で上記の1 $\mu\text{l}$ のコントロールHBV)ありもしくは無しで2連で実施した。反応は、サーモサイクラー中で94℃で1サイクル、次いで94℃1分間、60℃15秒間、および68℃15秒間を50サイクル行うことで実施した。非特異的プライミングを還元するために、サンプルは初めのサイクルの間に80℃に達するまで、サーモサイクラーブロックに加えなかった。

【0197】反応の程度を、実施例2で説明した同じプレート、プローブ、および形式を使用してマイクロタイタープレートアッセイによって分析した。反応(2連)の結果を以下に示した:

HBV+	1.407	0.377
標的なし	0.083	0.087,

【0198】上記に見られるように、2連の反応物から

生じるシグナルの量においていくらか変動が存在するが、単一プライマーを伴う増幅を実行した後、標的配列の存在の明らかな指標が存在した。

【0199】(実施例5) カルボキシ-dUTPを伴うプライマー伸長)

(i) カルボキシ-dUTPの合成

0.2Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.2)中に100マイクロモルのアリルアミン-dUTP(ENZO Diagnostics, Farmingdale, NY)を含む溶液5mlを、5mlのジクロロメタン(Aldrich, Milwaukee, WI)に溶解した20倍モル過剰の無水コハク酸(Aldrich, Milwaukee, WI)と共に混合した。この懸濁液を50mlのファルコンチューブに移し、そしてボルテックスした。水相のpHを、適量のトリエチルアミン(Aldrich, Milwaukee, WI)を加えることで9.2の値に再調整した。緩衝および再調整をpH値が安定するまで継続した。一定分量を採取し、アリルアミンのピークの消滅、およびカルボキシ改変生成物を表す遅れたピークの出現に対してHPLCで試験した。水相を取り除き、そして水で10倍に希釈し、そして0.05M炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(pH7.8)で前もって平衡化したDEAE-Sephadex A-50カラム中へ充填した。生成物を炭酸水素トリエチルアンモニウムの0.05M~0.70Mの勾配で抽出した。フラクションを採取し、290nmでのUV吸収で分析した。適切なフラクションはHPLCで純度をチェックした。>99.5%の純度を有するフラクションを一括にプールし、そして塩を30℃の真空中でロータリーエバポレーターで除去した。残留している固形物は適切な量の水に溶解し、および290nmでの吸収により判定した場合に最終的に10mMの濃度に調整した。一定分量を調製し、そして使用するまで-70℃で貯蔵した。

【0200】(i) プライマー伸長反応

プライマー伸長のためのテンプレートは、HBVの1.4kb挿入断片を含んだmp18クローンに由来するファージ粒子のPEG沈澱によって得られた1本鎖DNAであった。伸長のためのプライマーは、その配列がmp18ベクターのlac領域の部分に対して相補的であるPM-1であった。このプライマーに由来する配列は以下の通りである:

5' -CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'。

【0201】7.5 $\mu\text{g}$ の1本鎖DNAおよび80 $\mu\text{M}$ のPM1プライマーを含むDNA混合物300 $\mu\text{l}$ を作製した。0.5 $\mu\text{l}$ のポリメラーゼ、2 $\times$ 緩衝液、および200nMのdNTPを含有する分離した酵素混合物25 $\mu\text{l}$ を作製した。ここでそれぞれの条件についてひとつの反応物は通常のTTPを有し、およびひとつ



(32)

特開2000-37194

61

の反応物はカルボキシ-dUTPを有した。25 $\mu$ lのDNA混合物を、25 $\mu$ lの酵素混合物と混合し、そして30分間適切な温度でインキュベートした。

【0202】次のポリメラーゼをこの実施例で使用した: Exo(-) Klenow (Q単位/ml, NE Biolabs, Beverly, MAより), Taqポリメラーゼ (T単位/ $\mu$ l, GIBCO BRL, Gaithersburg, MDより), およびBstポリメラーゼ (4単位/ $\mu$ l, NE Biolabs, Beverly, MAより)。

【0203】緩衝液およびそれらの組成は以下のとおりである: 1 $\times$ NE緩衝液2 (N. E. Biolabs, Beverly, MA) は、10mMのTris-HCl, 10mMのMgCl<sub>2</sub>, 50mMのNaCl, および1mMのDTT (25℃でpH7.9) からなる。

【0204】緩衝液2Aは、pHが7.1であり、そしてMgCl<sub>2</sub>が2mMだけであること以外はNE緩衝液2と同じであった。

【0205】緩衝液2Mは、MgCl<sub>2</sub>が2mMだけであり、そして1mMのMnSO<sub>4</sub>も含んでいること以外はNE緩衝液2と同じであった。

【0206】1 $\times$ ThermoPol緩衝液 (N. E. Biolabs, Beverly, MA) は、20mMのTris-HCl (25℃でpH8.8), 10mMのKCl, 10mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mMのMgSO<sub>4</sub>, および0.1% Triton X-100からなる。

【0207】(iii) プライマー伸長反応の分析  
様々なポリメラーゼが基質としてカルボキシ-dUTPを利用する能力の評価は、多数の違った方法で実施され得る。本実施例において、これは、標識された前駆体を使用せずに、ゲル分析による1本鎖DNAの2本鎖形成への転換の評価によって定性的に観察された。この転換現象は、1本鎖前駆体と比較してのアガロースゲル中でのその移動の遅延によって、およびより効率的に臭化エチジウムに結合するその能力に起因する蛍光の増加によって見られ得る。この方法は、カルボキシ-dUTPの取り込みの研究の初期の評価で使用されたが、さらなる情報が、制限酵素で伸長生成物を消化することで得られ得る。この分析で使用される特定の制限酵素は1本鎖DNAを消化出来ないで、フラグメントの生成が制限酵素部位で2本鎖形成の指標である。環状DNAの環状小片への変形によって、異なったポリメラーゼによる転換量の比較評価をするのがより容易になる。加えて、様々な制限フラグメントの位置がプライマーに関連して知られているので、伸長した生成物の長さの評価が可能となる。

【0208】(iv) 制限酵素での消化  
プライマー伸長反応からのテンプレートが改造していないDNAからなるので、カルボキシ-dUTPの反応

62

は、正常である一方の鎖、およびどのTも認識部位の部分である限り半置換された制限部位を生成するカルボキシ-dUTP誘導体で完全に置換された相補鎖を含む。評価のために使用した酵素は、BstNIであり、その認識配列は、GG A/T CCである。コンピュータプログラムMacDNASIS (Hitachi Software Engineering America, Ltd, South San Francisco, CA) を個別にGG(T)CC およびGG(A)CC部位の位置を予測するために用いた。

【0209】(v) 反応の分析

図19は、様々な緩衝液、酵素および温度を用いた伸長反応の結果を示す。はじめに非置換dNTPを用いた反応が、カルボキシ-dUTPを用いた反応と異なるパターンを形成することが認められ得た。生成物におけるGG(T)CCおよびGG(A)CC配列の位置の分析によって、非置換反応のBstNI消化からのパターンが、GG(T)CCおよびGG(A)CC部位の両方での期待された消化に起因するが、カルボキシ-dUTPの反応がGG(A)CC配列でのみ消化を示したことが示された。反応はまた、基質としてdUTPを使用を行い、そして全ての部位に消化が存在し、このことはBstNIによる消化に対する耐性の原因がdUの使用よりはむしろカルボキシおよびそのリンカーの存在であったことを示す(データは示していない)。図20は、非台成についての(-) から、わずかに可視についての(+/-) および(++++) の評価付けまでの評価された合成のレベルに関する図19からの結果の縮小である。一般に、カルボキシ-U取り込みのための最もよい台成は、Bstポリメラーゼ/Thermopol緩衝液条件で見られた。

【0210】(実施例6 PCRにおけるMg++の必要性に対するカルボキシル-Uの効果) PCR増幅を、テンプレートとして2本鎖T7 DNA、ならびにプライマーとして2つのオリゴヌクレオチドTS-1およびTS-4を用いて行った。これらのオリゴヌクレオチドは、1995年12月15日出願された米国出願第08/574,443号に以前に記載され、そして622塩基対産物を生成する。400ngのT7 DNA, 50pMのTS-1, 50pMのTS-4, 1 $\times$ PE緩衝液 (BRL) 200mM dNTP, および15ユニットのTaqポリメラーゼ (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) からなる100 $\mu$ lの反応を行った。サイクリング条件は、94℃で50秒間、50℃で25秒間および68℃で3分間の25サイクルであった。図21はこの台成の結果を示す。通常のヌクレオチドを反応についての基質として使用した場合、1mM MgCl<sub>2</sub>は増幅に適切であった。対照的に、反応をカルボキシ-dUTPを用いて行った場合、2mM MgCl<sub>2</sub>はオリゴのダイマーのみ生成し、最低3mM

(33)

特開2000-37194

63

64

gCl<sub>2</sub>が適切なサイズのアンブリコンの合成に必要であった。

【0211】(実施例7 種々の熱安定ポリメラーゼ) 増幅を、全ての反応を3mM MgCl<sub>2</sub>の存在で行い、そして5ユニットのポリメラーゼのみを各反応に使用したことを除いて実施例X-22で記載されているように行った。Taqポリメラーゼ(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)をTfl, Tth, AmplithermおよびReplithermポリメラーゼ(全てEpicentre, Madison WIから)と比較した。全ての反応は、各酵素とともに供給された緩衝液を使用した。反応のゲル分析を、図22に示す。Taqの量を少なくさせると、実施例6で見られた反応と比較してカルボキシ-UTPの存在下で合成がかなり減少した。通常のTTPでは全く効果がなかった。他のポリメラーゼについて、評価可能な量の生成物を与えたたった1つの酵素はTthポリメラーゼであり、そしてこれは使用した条件下でTaqポリメラーゼよりもより活性であった。

【0212】(実施例8) 実施例7において、種々のポリメラーゼを用いる反応を、3mM MgCl<sub>2</sub>の存在下で行った。しかし、これらのポリメラーゼのいくつかによる合成の欠失は、カルボキシ-UTPが基質の場合、異なるMg<sup>++</sup>の濃度の必要性を反映し得る。カルボキシ-UTPの存在下で合成を示さなかったが、通常のTTPで多量の合成を与えた酵素の1つは、Tflポリメラーゼであった。この酵素を、上記と同じ反応条件下で試したが、2mM、4mMおよび6mMのMgCl<sub>2</sub>レベルを反応に使用した。さらに、同じ力価測定を、P E緩衝液(Perkin-Elmer, Foster City, CA)中のTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer, Foster City, CA)および5μlのPCR Enhancer(Stratagene, La Jolla, CA)を添加したTflポリメラーゼを用いて使用した。この結果を、図23に示す。使用した条件下で、6mM MgCl<sub>2</sub>がTaqポリメラーゼの合成に最高の量を与え、そしてTfl単独では、2、4、または6mM MgCl<sub>2</sub>で合成を示さなかった。しかし、PCR Enhancerをその反応に含ませた場合、Tflポリメラーゼは、検出可能な合成量を生成し得た。Taqと同様に、最も高いレベル

を6mM MgCl<sub>2</sub>で達成した。Tfl/PCR Enhancer反応について示された合成のレベルはまた、Taq反応よりも高かった。PCR Enhancerをカルボキシ-UTPを用いる増幅のために、他の熱安定ポリメラーゼTth, AmplithermおよびReplithermを用いて試した。この結果を、図24に示す。Amplithermポリメラーゼによって増幅を回復し得なかったが、Replithermポリメラーゼについては、ここで合成が示された。

実施例7でカルボキシ-UTPを用いて増幅を示す唯一のTaq以外のポリメラーゼであったTthポリメラーゼは、PCR Enhancerを用いた最も高いレベルの増幅を示した。また、一連のTth/PCR Enhancerについて、8mM MgCl<sub>2</sub>を用いた反応が6mM MgCl<sub>2</sub>の反応よりも多い増幅を与えた。

【0213】(実施例9 増幅の温度条件の変更) 2つのオリゴヌクレオチド、TS13およびTS14は(これらはまた、EN2に記載された(?)を、カルボキシ-dUTPの存在下でバクテリオファージT7 DNAの異なるセグメントの増幅のために使用した。これらのプライマーの生成物は、以前の実施例で合成された生成物より小さな136bpのアンブリコンである。連続的な一連のPCR反応は、2相で行った。各反応はTthポリメラーゼならびに上記のPCR Enhancerを使用した。各反応における第1相は、両方の鎖にカルボキシ-dUを含むテンプレートを作製するために上記のサイクリング条件を使用する一連の5サイクルである。各反応における第2相は、アニーリング工程、伸長工程または変性の工程についての種々のより低い温度を使用した。実験温度の予備的な試みは、80℃未満の温度がこのアンブリコンを用いて増幅を行うにおいて首尾良くないことを示し、その結果、最も高い温度と最も低い温度の間の差を近づける努力を、アニーリング温度を上げることによって行った。各セットの温度条件について、MgCl<sub>2</sub>レベルもまた、変化した。3セットのこれらの反応のゲル分析から得た結果の連続を、以下に与える：

【0214】

【表1】

JP,2000-037194,A

☒ STANDARD ☐ ZOOM-UP ROTATION ☐ No Rotation ☐ REVERSAL

RELOAD | PREVIOUS PAGE | NEXT PAGE || DETAIL

(34)

特開2006-37194

65	変性	アニーリング	伸長	MgCl <sub>2</sub>	66	合成
a) 80℃ 2分		55℃ 25秒	68℃ 2分	5mM		++
				4mM		+
				3mM		+/-
b) 80℃ 2分		60℃ 25秒	68℃ 2分	6mM		-
				5mM		-
				4mM		++
c) 80℃ 2分		60℃ 25秒	70℃ 2分	6mM		-
				4mM		++
				2mM		++

【0215】上記の反応に加えて、一連の反応を、68℃で2分間のアニーリング/伸長工程と組み合わせた80℃で2分間の変性工程を用いて行った。種々の因子もまた、反応の効率が增大し得るか否かを見るために、この圧縮サイクルに含ませた。これらの反応からの生成物をアウゲルを、図25に示す。最高と最低の温度の間の12℃ほどの小さな差でもアンプリコンの増幅がなお存在し、そしてこれらの温度条件下での合成を増幅するようである唯一の因子は、さらなるポリメラーゼの添加であると理解され得る。

【0216】(実施例10 プライマー配列における改変による圧縮増幅増強条件に対する効果) 上記のTS13およびTS14プライマーに加えて、最高温度と最低温度の間の範囲がさらに圧縮されるか否かを見るためにこれらの配列の変化を有するプライマーを設計した。TS13、TS14プライマーのための配列およびそれらの改変ならびにそれらが由来したT7ゲノムの領域を、図26に示す。これらのプライマーの配列の違いは、アンプリコンのサイズにおいていくつかの小さな変化をつくるが、本質的に同じT7セグメントはこれらのプライマーを用いた各反応で増幅された。

【0217】一連の反応を、図26からプライマーの種々の組み合わせを用いて行った。80℃で2分間および68℃で2分30秒間の2サイクルを用い、変性工程とアニーリング/伸長工程との間で12℃の分断のみであった。これらの反応のゲル分析を、図27に示す。全てのプライマーの組み合わせは、適切なバンドの増幅を示したがそれらの効率に違いが存在した。コントロールもまた、通常のdTTPまたはアリルアミン-dUTPのいずれかがカルボキシ-dUTPの代わりに使われた反応のこのセットに含まれた；これらの反応は、検出可能なレベルの増幅を与えなかった。

【0218】プライマーの同じ組み合わせを、80℃で2分間および72℃で2分30秒間の20サイクルで増幅反応において試した。これらの反応のゲル分析を、図28に示す。これらの温度条件において、ほとんどのプ

ライマーの組み合わせは増幅し得なかった。しかし、プライマー対の1つとしてTS23プライマーを含んでいた全ての反応は、増幅を与えた。TS23プライマーとともに用いられた他のプライマーに関して、増幅の相対的レベルは、TS21>TS22>TS13の順番であった。他の因子が含まれることもあり得るが、この影響付けは、テンプレート鎖のセグメント中に存在するカルボキシ-dUTP部分、ここに、プライマーが結合する数に対して逆の関係に開し得る。なぜなら、TS21、TS22、TS13プライマーについてそれぞれ10、11、14であるからである。図28に示した結果は、カルボキシ-dUTPを基質として用いる場合、増幅が変性温度とアニーリング/伸長温度との間がたった8℃の違いで行われ得ることを示す。

【0219】(実施例11 プライマー伸長生成物の合成後の改変) プライマー伸長反応を、アリルアミン-dUTPの存在で行った。反応のためのテンプレートは、以下の配列を有した：

5'-AGGTAACCTTA AGATGGTCAG  
GCTGAAAGGAGGAACCTATATC TGC  
AGAA-3'.

【0220】反応に用いたプライマーは、前記のTS14であった。反応混合物は、各反応についての12μlの最終容積について1μlのTS14プライマー(100pmoles)、1μlのテンプレート(100pmoles)、2μlの25mM MgCl<sub>2</sub>、2μlの400μM dGTP/dCTP/dATP、2μlアリルアミン ddUTP (ENZO Diagnostics, Farmingdale, NY)、1μlのAmpliTaq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer, Emeryville, CA)、1~3μlのTAPS緩衝液および0~2μlのH<sub>2</sub>Oからなっていた。TAPS緩衝液は、他の指示がない限りpH9.8で200mM TAPS (SIGMA, St. Louis, MO)、500mM KClからなっていた。反応は、種々のレベルのTAPS緩衝液を有し、そしてpHもま

(35)

特開2000-37194

67

た種々であった。各反応についての詳細を与え、そして反応における量を評価し、そして図29および30に記載する。コントロールとして、酵素を含まないまたはアリアルミンddUTPの代わりにフルオレsein ddUTP (ENZO Diagnostics, Farmingdale, NY) を用いた反応もまた含んだ。反応混合物を、94℃で1分間加熱し、次に68℃で1時間インキュベートした。

【0221】反応物を、微小遠心管中で短時間遠心分離し、そして1μlの50mMフルオレsein-5 (6) カルボキシアミド-カブロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (F1-NHSエステル) を各反応物に添加し、そして37℃で3時間インキュベートした。台成および標識の程度を、アクリルアミドゲル電気泳動により評価した。フルオレsein標識は、UV照射器上にゲルを置き、そしてWratten 58 Kodak Filter (SIGMA, St. Louis, MO) を用いてガラロイド写真を露光することにより同定した。次いでゲルを、20分間エチジウムブロミドで染色し、続いて20分間脱染色し、そして通常のフィルターを用いて写真を露光した。図29は種々の反応条件の各々の取り込まれたフルオレsein (一番上のゲル) およびエチジウムブロミド染色 (底のゲル) により提供される蛍光を示す。これらのゲルの写真はまた、スキャンし、そしてそれら各々のネガを作った。この結果を、図30に示す。ネガは、実験の結果のよりよい評価を提供する。反応に用いられる種々の条件下で蛍光シグナルを生成し得る、生じた伸長生成物が存在することが写真上に見られ得る。最も高いレベルは、pH9.7で3×TAPSDで達成されたようである。この実験はまた、フルオレseinで予め改変したddUTPを用いたコントロールよりも台成標識でより高いシグナルの生成があることを示した (レーン8)。下方のゲル中で見られる台成の程度はまた、たとえ予め改変したddUTPの最小の取り込みが存在したとしても、通常の塩基の取り込みが存在したレーン8における上位のバンドの存在で見られ得る。このアプローチの有用性を示す。

【0222】多くの明らかな改変は、本発明の上記の詳細な説明を鑑みて当業者に示唆される。全てのそのような明らかな改変は、十分に考えられ、これ以下の請求の範囲に示す本発明の範囲および精神により包含される。

【0223】本発明は、直接的および非直接的な増幅を含む。目的の核酸配列を増幅させるための新規プロセスを提供する。直接的な増幅において、単一の初期プライマーまたは核酸構築物が増幅プロセスを行うために利用される。非直接的な増幅においては、第1の初期プライマーまたは核酸構築物は続く初期プライマーおよび核酸構築物を用いて使用される。本発明によって提供される他の非直接増幅プロセスにおいて、第1の初期プライマーまたは核酸構築物は、提供される目的の特定の核酸配

68

列およびその相補体を増幅するために第2の初期プライマーまたは核酸構築物を用いて配置される。非直接的な増幅が可能な単一のプライマーまたは単一の核酸構築物はまた、本発明に従う非直接的な増幅を行うためにも使用される。核酸配列決定のための終結後標識プロセスもまた、鎖ターミネーターとして提供された化学的反応基に共有結合したタグ化分子の検出に基づく本発明中で開示される。相補的な配列に対する熱力学的安定性が減少した核酸配列を生成するためのプロセスもまた提供され、そして本発明によって達成される。他の新規組成物、キット等に加えて、独特の核酸ポリマーもまた開示され、そして提供される。

【0224】

【発明の効果】本発明により、核酸増幅、核酸配列決定、および重要な特徴 (例えば、低限した熱力学的安定性) を有する独特の核酸の生成に有用かつ応用可能である新規のプロセスが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】新規のプライマーによる直接的増幅を示す模式図である。

【図2】新規のプライマーおよび標準的なプライマーによる非直接的増幅を示す模式図である。

【図3】一対の新規のプライマーによる非直接的増幅を例示する模式図である。

【図4】それらの配列の一部を、テンプレートとして使用されることから防ぐ改変を含む、一対の新規のプライマーによる非直接的増幅を示す模式図である。

【図5】構築物の一部がテンプレート依存性伸長後にヘアピン形成し得る2つの3'末端を有する核酸構築物によって行われ得る一連の反応を示す模式図である。

【図6】図5に示されるプロセスおよび事象の続きを示す模式図である。

【図7】2つの3'末端を有する核酸構築物によって行われ得る一連の反応を示す模式図である。ここで、3'末端の各々は、テンプレート依存性伸長後にヘアピンを形成し得る。

【図8】図7に示されるプロセスおよび事象の続きを示す模式図である。

【図9】非直接的に増幅し得る単一のプライマーの、テンプレート依存性伸長および自己プライミング/自己伸長を例示する模式図である。

【図10】図9のプロセスおよび事象の続きを示す模式図である。潜在的な分子内アニーリングおよび分子間アニーリングは、配列の連続付加を可能にする。

【図11】図10におけるプロセスおよび事象の改変をさらに例示する模式図である。ここで、初期プライマーは、プライマーの部分テンプレートとして使用されることを可能にしない改変を含む。

【図12】非直接的に増幅し得る2つの3'末端を有する新規の核酸構築物を例示する模式図である。

(16)

特開2000-37194

69

70

【図13】非直線的に増幅し得る2つの3'末端を有する新規の核酸増幅物についての別の設計の例を示す模式図である。

【図14】図13に示されるプロセスおよび事象の続きを示す模式図である。

【図15】非直線的に増幅し得る2つの3'末端を有する新規の核酸増幅物についての別の設計の例を示す模式図である。

【図16】図15に示されるプロセスおよび事象の続きを示す模式図である。

【図17】PCRによって作製される標的の等価増幅のゲルアッセイを示す電気泳動写真である。

【図18】HPVプラスミドDNAの等価増幅についてのゲルアッセイおよびプレートアッセイの結果をそれぞれ示す電気泳動写真および表である。

【図19】そこで規定される種々の反応条件下での、カルボキシdUTPおよび正常なdTTPでのPCR反応についてのゲルアッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図20】図19の結果を要約する表である。

【図21】カルボキシdUTPの存在下での、PCR台成における種々のレベルのMgCl<sub>2</sub>の効果を示す電気泳動写真である。

【図22】カルボキシdUTPの存在下でPCR台成を行うための、種々のポリメラーゼの能力についてのゲル\*

\*アッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図23】カルボキシdUTPの存在下での、種々の酵素でのPCR台成における種々のレベルのMgCl<sub>2</sub>の効果を示す電気泳動写真である。

【図24】カルボキシdUTPおよびPCRエンハンサーの存在下での、種々の酵素でのPCR台成における種々のレベルのMgCl<sub>2</sub>の効果を示す電気泳動写真である。

【図25】カルボキシdUTPの存在下での、PCR台成における種々の添加物の効果を示す電気泳動写真である。

【図26】カルボキシdUTPの存在下でのPCR台成に使用される、テンプレートおよびプライマーの配列を示す図である。

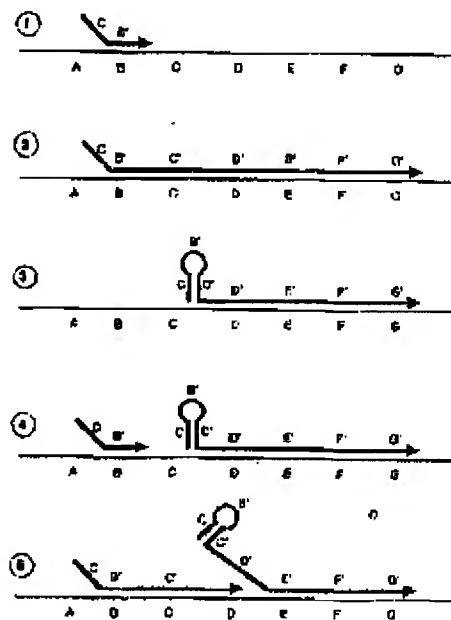
【図27】カルボキシdUTPの存在下での、PCR台成のためのプライマーの種々の組合せについてのゲルアッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図28】そこに示される異なる温度での、カルボキシdUTPの存在下での、PCR台成のためのプライマーの種々の組合せについてのゲルアッセイの結果を示す電気泳動写真である。

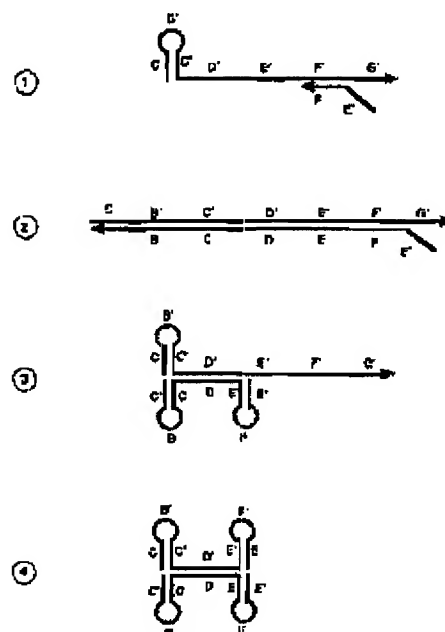
【図29】蛍光マーカの合成的な付着後に使用される種々の条件についてのゲルアッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図30】図29の結果のネガティブ画像である。

【図1】



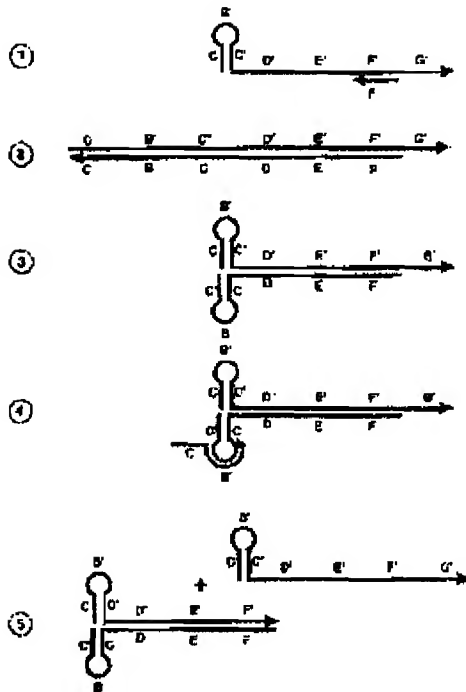
【図3】



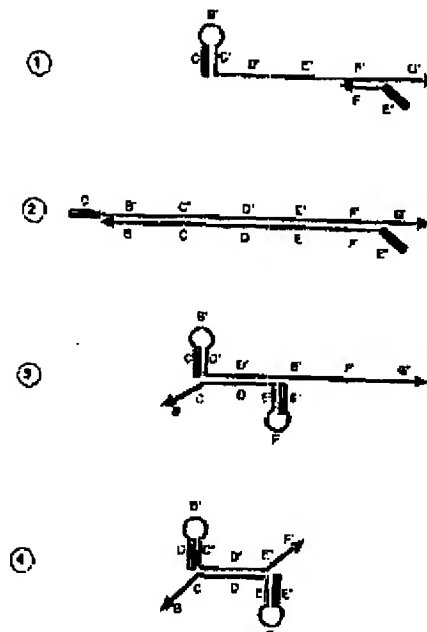
(37)

特開2000-37194

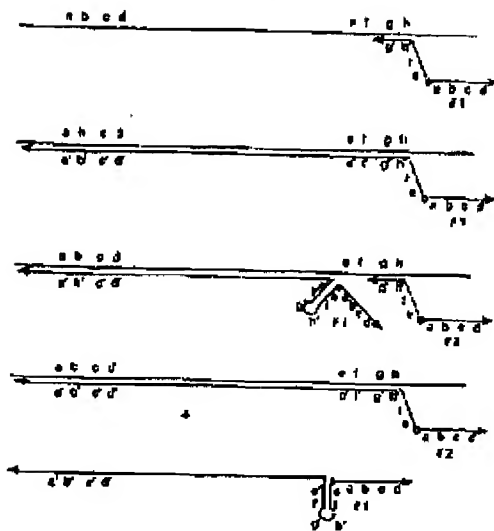
【図2】



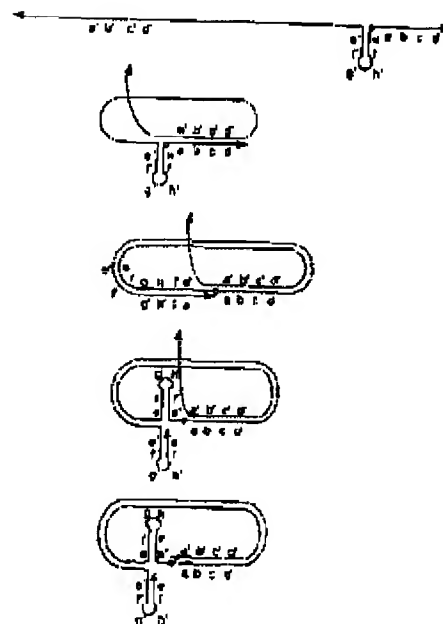
【図4】



【図5】



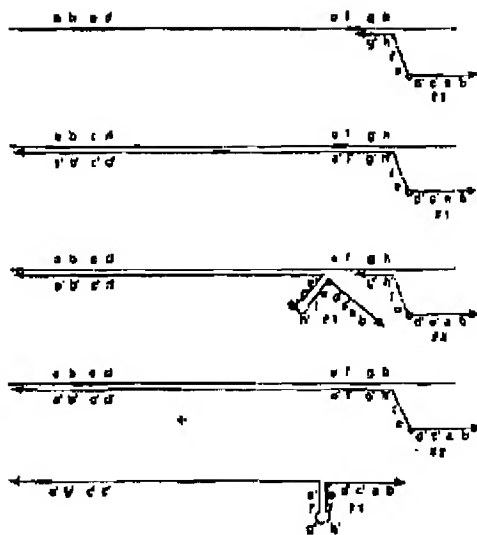
【図6】



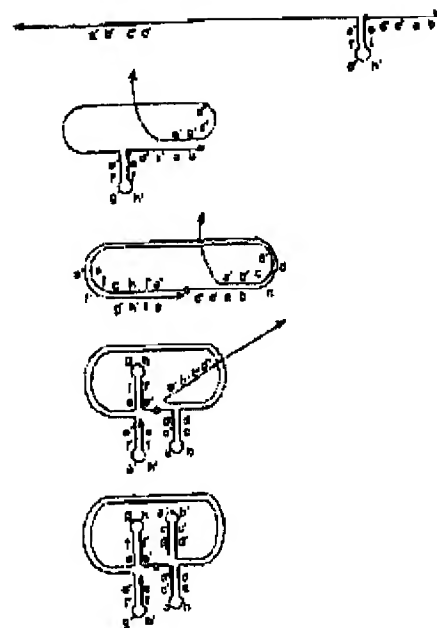
(38)

特開2000-37194

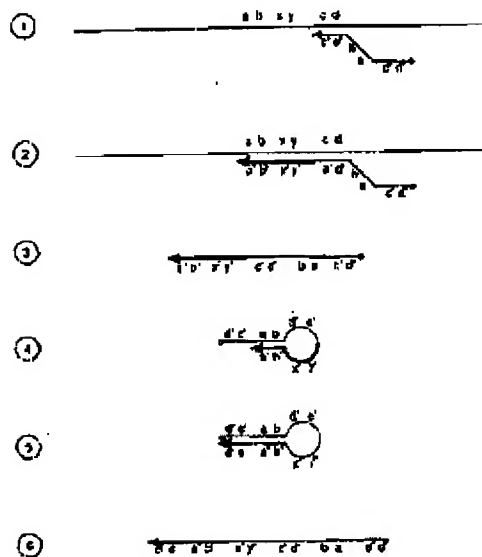
【図7】



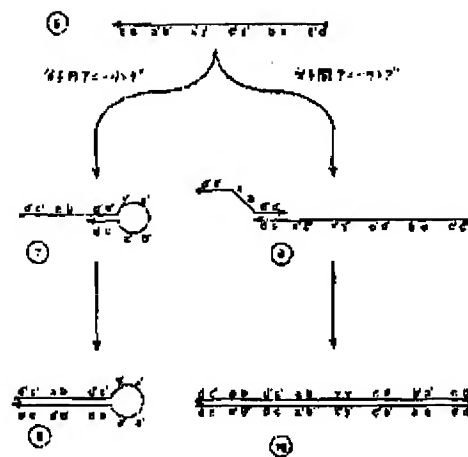
【図8】



【図9】



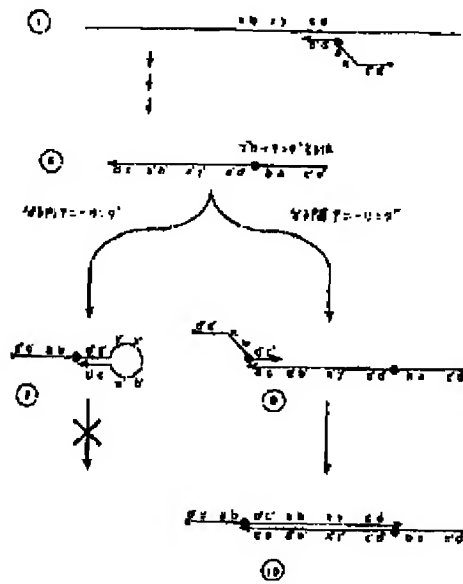
【図10】



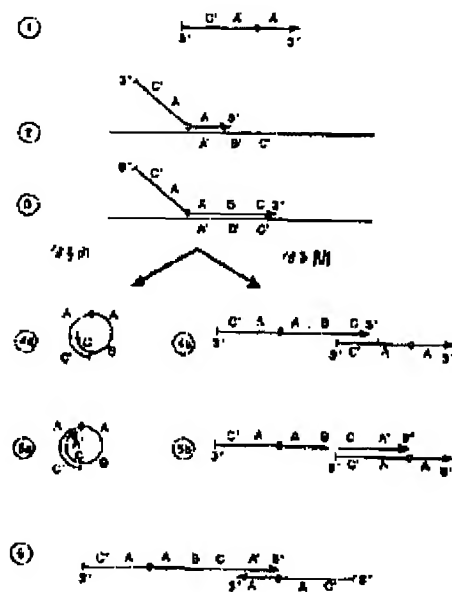
(39)

特開2000-37194

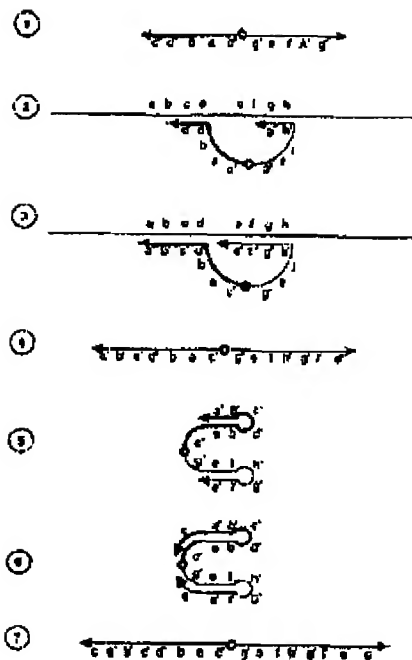
【図11】



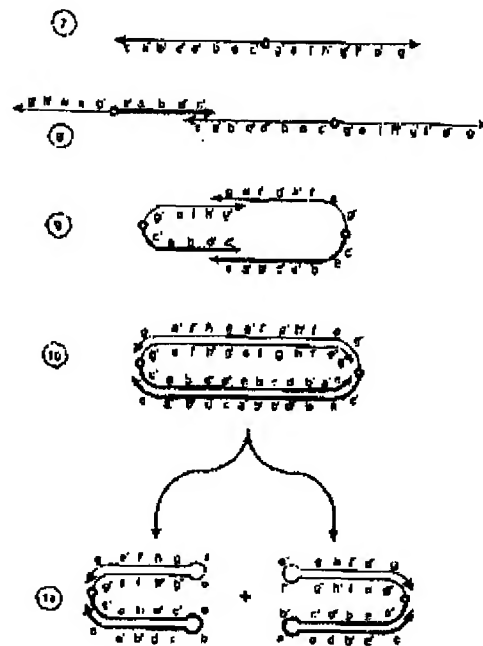
【図12】



【図13】



【図14】

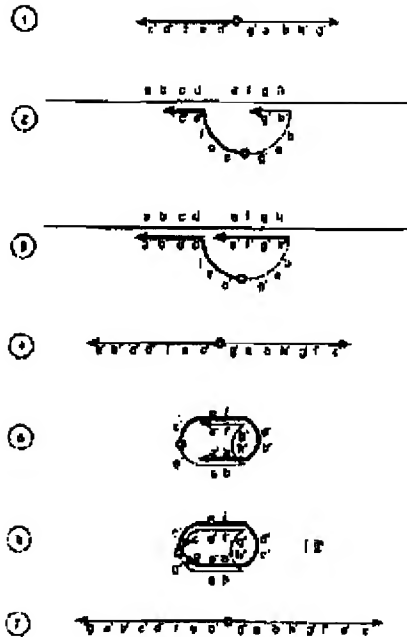




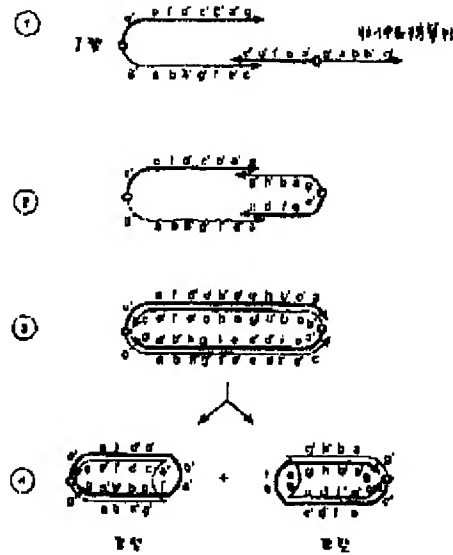
(40)

特開2090-37194

【図15】

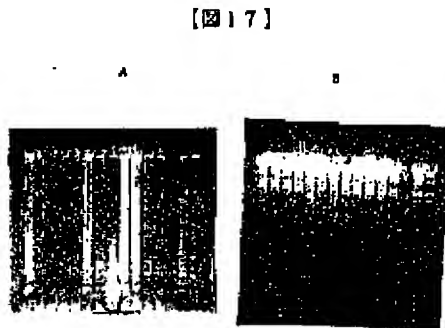


【図16】



【図18】

【図25】



30分 70°C 10分

100分 70°C 10分

※ 70°C 10分  
※ 70°C 10分  
※ 70°C 10分  
※ 70°C 10分  
※ 70°C 10分



1. 70°C 10分  
2. 70°C 10分  
3. 70°C 10分  
4. 70°C 10分  
5. 70°C 10分  
6. 70°C 10分  
7. 70°C 10分

1. 70°C 10分  
2. 70°C 10分  
3. 70°C 10分  
4. 70°C 10分  
5. 70°C 10分  
6. 70°C 10分  
7. 70°C 10分  
8. 70°C 10分  
9. 70°C 10分  
10. 70°C 10分  
11. 70°C 10分  
12. 70°C 10分  
13. 70°C 10分  
14. 70°C 10分  
15. 70°C 10分  
16. 70°C 10分

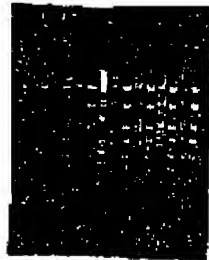
※ 70°C 10分

70°C 10分	70°C 10分	70°C 10分	70°C 10分
1.707	1.504	0.376	0.085

(41)

特種2000-37194

【圖 19】



【图20】

試料	測定法	温度	分析時間	全炭素含有率 (%)
7-1/5	NEB #2	37°C	分析時間 15分 正誤 T	+ +++
7-1/7	2A	37°C	分析時間 15分 正誤 T	- ++
7-1/7	NEB #2	35°C	分析時間 15分 正誤 T	+ +++
7-2	NEB #2	35°C	分析時間 15分 正誤 T	++ ++++
7-3	2A	35°C	分析時間 15分 正誤 T	++ +++
7-5	Fluoropad	35°C	分析時間 15分 正誤 T	+ ++++
7-7	2A	35°C	分析時間 15分 正誤 T	++ +++

1	0-0-1-1-1-1, 7-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
2	1-1-1-1, 7-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
3	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
4	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
5	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
6	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
7	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
8	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
9	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
10	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
11	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
12	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
13	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
14	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
15	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0
16	0-0-1-1, 0-0-0-0, 0-0-0-0, 0-0-0-0

【圖 23】



【图24】



【圖21】



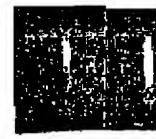
【圖22】



【圖27】



【图28】



1.  $\sin 15^\circ = \frac{1}{2} \sin 30^\circ$
2.  $\cos 15^\circ = \frac{1}{2} \cos 30^\circ$
3.  $\tan 15^\circ = \frac{1}{2} \tan 30^\circ$
4.  $\cot 15^\circ = \frac{1}{2} \cot 30^\circ$
5.  $\sec 15^\circ = \frac{1}{2} \sec 30^\circ$
6.  $\csc 15^\circ = \frac{1}{2} \csc 30^\circ$
7.  $\sin 45^\circ = \frac{1}{2} \sin 90^\circ$

7. 田中 隆雄 T. Tanaka
8. 田中 T. Tanaka
9. 田中 T. Tanaka
10. 田中 T. Tanaka
11. 田中 T. Tanaka
12. 田中 T. Tanaka
13. 田中 T. Tanaka
14. 田中 T. Tanaka
15. 田中 T. Tanaka
16. 田中 T. Tanaka
17. 田中 T. Tanaka
18. 田中 T. Tanaka
19. 田中 T. Tanaka
20. 田中 T. Tanaka
21. 田中 T. Tanaka
22. 田中 T. Tanaka
23. 田中 T. Tanaka
24. 田中 T. Tanaka
25. 田中 T. Tanaka
26. 田中 T. Tanaka
27. 田中 T. Tanaka
28. 田中 T. Tanaka
29. 田中 T. Tanaka
30. 田中 T. Tanaka
31. 田中 T. Tanaka
32. 田中 T. Tanaka
33. 田中 T. Tanaka
34. 田中 T. Tanaka
35. 田中 T. Tanaka
36. 田中 T. Tanaka
37. 田中 T. Tanaka
38. 田中 T. Tanaka
39. 田中 T. Tanaka
40. 田中 T. Tanaka
41. 田中 T. Tanaka
42. 田中 T. Tanaka
43. 田中 T. Tanaka
44. 田中 T. Tanaka
45. 田中 T. Tanaka
46. 田中 T. Tanaka
47. 田中 T. Tanaka
48. 田中 T. Tanaka
49. 田中 T. Tanaka
50. 田中 T. Tanaka
51. 田中 T. Tanaka
52. 田中 T. Tanaka
53. 田中 T. Tanaka
54. 田中 T. Tanaka
55. 田中 T. Tanaka
56. 田中 T. Tanaka
57. 田中 T. Tanaka
58. 田中 T. Tanaka
59. 田中 T. Tanaka
60. 田中 T. Tanaka
61. 田中 T. Tanaka
62. 田中 T. Tanaka
63. 田中 T. Tanaka
64. 田中 T. Tanaka
65. 田中 T. Tanaka
66. 田中 T. Tanaka
67. 田中 T. Tanaka
68. 田中 T. Tanaka
69. 田中 T. Tanaka
70. 田中 T. Tanaka
71. 田中 T. Tanaka
72. 田中 T. Tanaka
73. 田中 T. Tanaka
74. 田中 T. Tanaka
75. 田中 T. Tanaka
76. 田中 T. Tanaka
77. 田中 T. Tanaka
78. 田中 T. Tanaka
79. 田中 T. Tanaka
80. 田中 T. Tanaka
81. 田中 T. Tanaka
82. 田中 T. Tanaka
83. 田中 T. Tanaka
84. 田中 T. Tanaka
85. 田中 T. Tanaka
86. 田中 T. Tanaka
87. 田中 T. Tanaka
88. 田中 T. Tanaka
89. 田中 T. Tanaka
90. 田中 T. Tanaka
91. 田中 T. Tanaka
92. 田中 T. Tanaka
93. 田中 T. Tanaka
94. 田中 T. Tanaka
95. 田中 T. Tanaka
96. 田中 T. Tanaka
97. 田中 T. Tanaka
98. 田中 T. Tanaka
99. 田中 T. Tanaka
100. 田中 T. Tanaka

1. Map 1 7-8-
2. 7513 + 7514
3. 7513 + 7523
4. 7513 + 7524
5. 7521 + 7514
6. 7521 + 7523
7. 7521 + 7524
8. 7522 + 7514
9. 7523 + 7522
10. 7522 + 7524
11. Map 1 7-8-
12. 7523 + 7514 (2-8-80 7523-80-1)
13. 7512 + 7514 (7-8-80 7512-80-1)
14. 7513 + 7514 (2-8-80 7513-80-1)

1. 1512 + 1514
2. 1512 + 1521
3. 1513 + 1526
4. 1521 + 1526
5. 1521 + 1524
6. 1522 + 1514
7. 1522 + 1521
8. 1522 + 1526
9. 1522 + 1524
10. 1522 + 1526
11. 1522 + 1526



(43)

特開2000-37194

【図29】

第1層



3層の構造



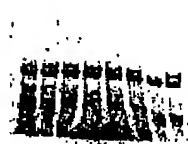
- 1 1.1 TAPL, pH 9.2
- 2 1.2 TAPL, pH 9.2
- 3 1.3 TAPL, pH 9.2
- 4 1.4 TAPL, pH 9.2
- 5 1.5 TAPL, pH 9.2
- 6 1.6 TAPL, pH 9.2
- 7 1.7 TAPL, pH 9.2
- 8 1.8 TAPL, pH 9.2

【図30】

第1層



3層の構造



- 1 1.1 TAPL, pH 9.2
- 2 1.2 TAPL, pH 9.2
- 3 1.3 TAPL, pH 9.2
- 4 1.4 TAPL, pH 9.2
- 5 1.5 TAPL, pH 9.2
- 6 1.6 TAPL, pH 9.2
- 7 1.7 TAPL, pH 9.2
- 8 1.8 TAPL, pH 9.2

フロントページの続き

(71)出願人 599088586

c/o Enzo Biochem. in  
c., 527 Madison Aven  
ue (8th Floor), New  
York, New York 10022,  
U. S. A.

(72)発明者 イライザ ラバニ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10093,  
ニューヨーク, フィブス アベニュー  
(ナンバー19エイ) 59

(72)発明者 ジャニス ジー. スタブリアノボウラス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11706,  
ベイ ショア, ナンバー19エー,  
サウス クリントン アベニュー 99

(72)発明者 ジェイムズ ジェイ. ドネガン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11561,  
ロング ビーチ, イースト ブロード  
ウェイ (ナンバー3ジー) 210

(72)発明者 ジャック コールマン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11731,  
イースト ノースポート, ファーウ  
ッド ドライブ 37

(72)発明者 マーリーン ウォルナー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11735,  
ファーマーデイル, アパートメント  
3, ノース メイブル ストリート  
15